ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. IX No 4

1 9 6 0

4 JUL 1961

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. IX No 4

1960
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek rzeczywisty PAN — Lublin, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Wrocław, Eugeniusz Pijanowski, członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Radaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Dział rolny — J. Gołębiowska, Poznań
Dział przemysłowy — J. Jakubowska, Łódź i S. Bujak, Lublin

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
ODDZIAŁ WROCŁAWSKI

Nakład 1041+129 egz.	Oddano do składania 10. IX. 1960 r.
Ark. wyd. 6,25, ark. druk. 5,25.	Podpisano do druku 22. XII. 1960 r.
Papier druk. sat. kl. III, 80 g,	Druk ukończono w grudniu 1960 r.
Cena zł 10,—	Nr zam. 216/60. H-14/292.

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 303—313

K. Bassalik, L. Janota-Bassalik, C. Olczyk, H. Halweg

MÉTHODES DE RECHERCHES MICROBIOLOGIQUES SUR LES SUBSTANCES ACTIVES DES EXTRAITS DE TOURBES

Institut de Physiologie Végétale à l'Université de Varsovie

Manuscrit reçu le 2. VII. 1960

En 1956 ont été entammées, à l'Institut de Physiologie Végétale de l'Université de Varsovie, les recherches sur l'effet des substances actives des extraits de tourbes sur la microflore des tourbes. Les recherches sur les substances actives du sol, commencées par Bottomley (1920) sont continuées dans plusieurs laboratoires scientifiques (Lochhead 1958). On applique dans ces recherches des différentes méthodes et techniques, dont les modifications, les plus importantes, concernent la composition des milieux de culture et la manière de les préparer, ainsi que la technique de déterminer le nombre général de bactéries dans les recherches microbiologiques. Les travaux de Norman (1958) et de Strunjak (1959), sans parler d'autres, temoignent quel est l'effet de ces modifications sur les résultats des recherches.

Dans les recherches continuées dans notre Institut pendant quatre ans, on a mis au paint la méthode de recherches sur les substances actives des extraits de tourbes qui assure des résultats incontestables.

I. TECHNIQUES EXPERIMENTÉES

TECHNIQUES D'OBTENIR LES EXTRAITS

Dans nos premières expériences nous employions les extraits obtenus de la tourbe imbibée à l'avance de l'eau distilée, bouillie (Bassalik et collab. 1957). Ayant établi que l'effet stimulant de ces extraits sur le développement de la microflore était relativement faible, nous avons choisi une autre technique de les obtenir, que voilà.

On mettait la tourbe dans des petits sacs en totile de lin, par lots de 100 g, pour la presser ensuite dans une presse à main, toujours jusqu'au même pas de vis. Pour protéger les extraits contre l'action de métal, les paroisses de la presse étaint tapissées de matière synthétique. Après la conservation dans une glacière, les extraits étaient décantés. De 100 g de tourbe on obtenait, selon le type de tourbe et selon les quantités de précipitations atmosphériques avant la prise d'échantillons, de 20 à 40 ml d'extrait. L'extrait était ajouté toujours au même volume de milieu de culture.

Les quantités maximum de micro-organismes qui se développaient dans un milieu de culture enrichi de l'extrait, étaient les suivantes: dans le cas de l'extrait obtenu de la tourbe imbibée et stérilisée à froid — 206 p. 100; de l'extrait naturel stérilisé à froid — 488 p. 100; de l'extrait obtenu sous l'action de la chaleur dans un autoclave — 144 p. 100; de l'extrait naturel stérilisé par la chaleur — 390 p. 100.

Ces résultats obtenus avec les extraits de la même tourbe ont révélé que les extraits naturels étaient tout particulièrement riches en substances actives. Nous nous en servions dans les recherches détaillées.

MÉTHODES DE STÉRILISATION DES EXTRAITS

La stérilisation des extraits de tourbes sans les soumettre à l'action de la chaleur et sans les séparer des substances macromoléculeuses sur le filtre bactériologique — constituait un problème spécial du présent travail. Nous avons mis au point la technique de stériliser les extraits à l'aide d'oxyde d'éthylène (Bassalik et collab. 1957). Dans des cas où l'on rencontrait des bactéries tout particulièrement résistantes contre l'oxyde d'éthylène, on était obligé de répéter la stérilisation à deux et même à trois reprises. Dans certaines expériences on a effectué la stérilisation en passant les extraits sur le filtre d'asbeste Seitz EKS 1797.

Une partie d'extraits était stérilisée par tyndallisation (chauffage à 100°C pendant une demi-heure, opération répétée trois fois à 1 jour d'intervalle).

FRACTIONNEMENT D'EXTRAITS

En dehors des expériences avec les extraits naturels de tourbes, on en a effectué également avec les fractions de ces extraits, et notamment avec la matière sèche, avec les cendres et avec le distillat. La technique d'obtenir les fractions stérilisées par l'action de la chaleur, était la suivante:

Le point de départ du fractionnement était l'extrait d'une seule tourbe, décanté et neutralisé jusqu'au *pH* 7,0. Une partie de cet extrait a été

stérilisée par la tyndallisation. D'une autre partie on a distillé, sous la pression normale et à la température de 100°C, les substances volatiles avec la vapeur d'eau. Le résidu, épaissi à la suite de la distillation, a été séché à 105°C jusqu'au poid constant. Une partie de matière sèche a été brûlée pour en obtenir des cendres. Le broyat de cendres et celui de matière sèche ohnt été suspendus dans l'eau redistillée et stérlisée par tyndallisation. De même a été stérilisé le distillat.

Dans le cas où les fractions étaient stérilisées à froid, la distilation était réalisée sous la pression de 14 à 15 mm Hg, à la température d'ébullition de 21 à 24°C. Le résudu de cette distillation était ramené au poid constant dans la température de 40°C. Aussi bien le distillat que la matière sèche, après être suspendus dans l'eau redistillée, étaient stérilisés par l'oxyde d'éthylène.

Les quantités équivalentes d'extraits stériles et de fractions d'extraits, étaient ajoutées au volume égal de gélose d'une double concentration.

Aussi bien les extraits que les fractions d'extraits stérilisés à froid, étaient ajoutés à la gélose dissoute et refroidie jusqu'aux 45°C, juste avant d'être coulés en boîtes de Petri.

LE *pH* DES MILIEUX DE CULTURE

Pendant quatre ans de recherches on a pu établir que le *pH* des xtraits de tourbes varie considérablement (de 5,0 à 7,0, et dans un seul cas même jusqu'à 7,7), selon la tourbe et selon les quantités de précipitations atmosphériques actuelles. On a donc examiné l'effet d'un milieu de culture à *pH* reduit jusqu'à 5,0 sur le développement de la microflore de tourbes.

A la suite de deux expériences, on a constaté que le *pH* de milieu reste sans influence sur la quantité de micro-organismes: dans un milieu de culture avec l'extrait de tourbe le nombre moyen de colonies était presque égal, soit à *pH* 5,0, soit à *pH* 7,0. C'est seulement l'aspect de ces colonies qui changeait: dans un milieu à *pH* 7,0 les colonies étaient beaucoup plus grandes.

Toutes les recherches détaillées étaient effectuées dans des milieux de culture neutralisés jusqu'à *pH* 7,0.

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

Les recherches préliminaires ont été faites sur une gélose avec l'extrait de tourbes, enrichie d'une seule substance connue — 1 p. 100 de glucose.

Les resultats des expériences ont révélé que la stérilisation de l'extrait de tourbe par la filtration élimine une partie considérable de composés azotiques de l'extrait. C'est pourquoi, pour éviter des fausses

interprétations les recherches détaillées ont été effectuées dans des milieux enrichis, en dehors de glucose, aussi de sels suivants: 0,12 p. 100 de NO_3NH_4; 0,1 p. 100 de PO_4K_2H; 0,05 p. 100 de $SO_4Mg \cdot 7H_2O$, ainsi que de la solution d'oligoéléments Hoagland, modifiée selon K. Bassalik, à raison de 1 ml pour 1 l de milieu de culture. L'eau redistillée.

Prenant en considération l'action sélective des milieux contenant comme source de carbone la glucose, on a également examiné l'effet de l'absence de glucose sur le nombre et sur la qualité de colonies microbiennes. Les micro-organismes cultivés dans des milieux privés de glucose, avaient à leur disposition uniquement les substances organiques contenues soit dans les extraits soit dans la matière sèche des extraits. Le tableau 1 résume les résultats quantitatifs des cultures réalisées en printemps et en automne à 25°C. Les données concernent la tourbe structurale et la tourbe pulvérulente. Dans les recherches de printemps on a employé l'extrait et la matière sèche de l'extrait stérilisés par la chaleur, dans celles effectuées en automne — par l'oxyde d'éthylène. Dans les recherches de printemps l'absence de glucose dans les milieux de culture avec les extraits diminua le nombre de micro-organismes dans les deux tourbes examinées. En automne, les recherches analogiques n'ont révélé qu'un effet minime de l'absence de glucose dans le milieu.

Dans les milieux de culture avec la matière sèche de l'extrait, un nombre beaucoup plus grand de micro-organismes se développait en absence de glucose qu'en sa présence. Le fait caractéristique pour la majorité de cas où l'absence de glucose rendait possible le développement d'un nombre considérable de micro-organismes, c'est qu'une rapide croissance visible commençait entre le quatrième et le septième jour après l'ensemencement.

Les observations de colonies en boîtes de Petri au point de vue qualité, ont révélé une diminution considérable de la vitesse de croissance et de la masse de d'accroissement dans un milieu de culture sans glucose. Un tel milieu pourrait servir dans les expériences spéciales (par exemple pour isoler les micro-organismes aux exigences alimentaires spéciales et dont le développement est empêché par des concentrations habituelles de glucose). Il est à noter, cependant, que dans ce milieu les observations sont difficiles à faire.

Les recherches détaillées ont été effectuées dans un milieu complet dont la composition est citée plus haut. Le milieu standard, également complet, ne comprend ni de l'extrait ni des fractions de l'extrait de tourbes. La question de trouver le milieu de culture le plus favorable, le plus éfficace dans les recherches sur la microflore de tourbes, éxige des études spéciales.

Les germes de micro-organismes étaient isolés dans un milieu de

culture comprenant 1 p. 100 de glucose, 0,1 p. 100 de pepton, 0,1 p. 100 de HPO_4K_2, 0,05 p. 100 de SO_4Mg, l'eau de ville, *pH* 7,0.

INTERVALLES ENTRE LA PRISE DES ÉCHANTILLONS ET L'ENSEMENCEMENT

On a examiné l'effet de l'intervalle entre le moment de la prise des échantillons de tourbes et celui de l'ensemencement, sur la qualité et la quantité de la microflore des tourbes.

Dans les échantillons de deux tourbes différentes on déterminait trois fois le nombre de micro-organismes: juste après leur arrivée c'est à dire 12 heures après leur prise, une semaine plus tard et trois semaines plus tard. Les échantillons d'environ 1 Kg chacun, étaient conservés dans les bocals en verre, en 7°C et en 22°C. On prenait le matériel de l'ensemen-

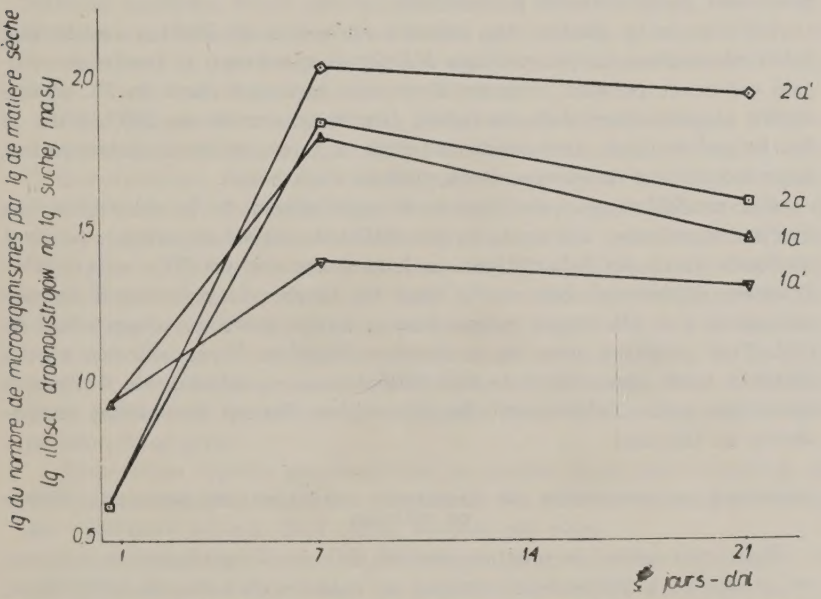


Diagramme I. Modifications du nombre des micro-organismes de la tourbe structurale et de la tourbe pulvérulente pendant la conservation des échantillons au laboratoire. Milieu de culture sans extrait.

Wykres I. Zmiany w ilości mikroorganizmów w torfie strukturalnym i rozpylonym podczas przechowywania próbek w pracowni. Pożywka bez wyciągu.

1a — tourbe structurale, temp. 22°C
1a' — tourbe structurale, temp. 7°C
2a — tourbe pulvérulente, temp. 22°C
2a' — tourbe pulvérulente, temp. 7°C

1a — torf strukturalny, temp. 22°
1a' — torf strukturalny, temp. 7°
2a — torf rozpylony, temp. 22°
2a' — torf rozpylony, temp. 7°

cement au fond des échantillons. Dans les calcules, on prenait en considération les modifications de teneur en eau. Le diagramme 1 présente une partie de résultats obtenus.

Au bout d'une semaine on a constaté une augmentation considérable du nombre de micro-organismes dans les deux tourbes. Dans la tourbe structurale le développement microbien était plus faible en 7°C et plus fort en 22°C. Dans la tourbe pulvérulente, par contre, ce développement était plus faible en 22°C. En général, vers le septième jour, dans les deux températures les micro-organismes étaient plus nombreux dans la tourbe pulvérulente que dans la tourbe structurale.

Au bout de trois semaines le nombre de micro-organismes dans les échantillons diminua, en restant toutefois supérieur au nombre obtenu à la suite du premier ensemencement. Les micro-organismes étaient plus nombreux dans la tourbe pulvérulente.

L'étude de la qualité des colonies en boîtes de Petri a révélé une petite diminution du pourcentage d'*Actinomycetes* dans la tourbe structurale conservée pendant trois semaines dans la température de 7°C et une légère augmentation dans la même tourbe conservée en 22°C. Dans la tourbe pulvérulente, indépendamment de la température de conservation, le pourcentage d'*Actinomycetes* augmenta visiblement.

Ces modifications quantitatives et qualitatives de la microflore des tourbes examinées, ont exclu la possibilité de conserver, même, pendant quelques jours, les échantillons au laboratoire soit en 7°C, soi en 22°C. D'autres expériences ont révélé dans les tourbes la présence d'organismes aptes à se développer même dans la température qui s'approchait de 0°C. C'est pourquoi, dans les recherches détaillées l'ensemencement était effectué juste après l'arrivée des échantillons au laboratoire, 12 heures après leur prise. Evidemment, les échantillons étaient transportés et conservés en thermos.

TECHNIQUE DE DÉTERMINER LES QUANTITÉS GÉNÉRALES DES MICRO-ORGANISMES DE TOURBES

Pour déterminer le nombre général de micro-organismes de tourbes, on se tenait à la méthode de compter les colonies en boîtes de Petri. Etant donné que quelques investigateurs (S t r u n j a k 1959) obtiennent selon cette méthode des nombres de bactéries par 1 g de matière sèche plusieurs fois plus élévés dans des cas de grandes dilutions, il convient de préciser plus exactement la technique adoptée dans ce travail. Il est aussi à souligner que, suivant cette méthode on a pendant cinq ans jamais remarqué d'essentielles différences numériques comme suite du différent degrés de dilution.

Dans le cas où l'on se servait, pour ensemencer les milieux de culture,

de dilutions de tourbes: $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$ — on obtenait des résultats suivants:

Dilution $1 \cdot 10^4$ — colonies trop nombreuses;
Dilution $1 \cdot 10^5$ — la première boîte de Petri — 104 colonies; la seconde — 88 colonies; la troisième — 91 colonies; la moyenne de trois boîtes — 94 colonies.
Dilution $1 \cdot 10^6$ — première boîte — 9 colonies; la seconde — 11 colonies; la troisième — 7 colonies; la moyenne de trois boîtes — 9 colonies.

Donc, la semence microbienne diluée 10 fois, contenait environ 10 fois moins de bactéries.

Ces résultats ont été obtenus grâce à une désintégration complète du matériel tourbeux, broyé pendant dix minutes dans un ballon avec un peu d'eau et avec beaucoup de petites boules en verre. En plus, pour préparer les solutions, on ne changeait pas de pipettes, mais on s'en servait d'une seule, rincée trois fois dans chaque dilution.

Dans les premières expériences faites dans la température de 25°C, on comptait les colonies en boîtes de Petri une seule fois, 48 heures après l'ensemencement, ou bien deux fois: deux jours plus tard et trois jours plus tard. On c'est apperçu cependant que, vue la croissance continue de micro-organismes, de tels résultats n'avaient qu'une valeur relative. Beaucoup plus encombrant mais aussi beaucoup plus efficaces sont les comptages répétés tous les deux ou trois jours (dans les températures plus basses, moins souvent) — jusqu'au moment où le nombre de bactéries cesse de changer. Les résultats obtenus présentaient alors la quantité générale de micro-organismes capables de se développer dans des conditions précises de nutrition, d'énergie, de température, d'humidité et de pression d'oxygène.

L'opération répétée plusieurs fois permettait aussi mieux préciser les différences numériques du développement des cultures microbiennes dans des différents milieux de culture, adoptés par nous.

Les diagrammes II et III présentent l'augmentation du nombre de micro-organismes cultivés dans les températures de 2°C et de 25°C.

II. DISCUSSION

La technique la plus répendue de déterminer le nombre général de micro-organismes, est celle de compter les colonies en boîtes de Petri. Cette technique est chargée de beaucoup d'erreurs, dont la plus importante est, paraît-il, l'emploi des agents selectifs tels que le milieu, la température et la pression partiale de l'oxygène. Pour se rendre compte,

ne serait-ce que partiellement, des erreurs commises, nous avons comparé le développement microbien de tourbes dans un milieu enrichi de glucose, de sels minéraux et d'extrait de tourbes d'une part, avec le développement dans le même milieu privé de glucose d'autre part. (Pour isoler les organismes sensibles à des substances actives du sol, Lochhead et Bourton, 1953, employaient la gélose enrichie seulement d'etrait du sol). Il fut établi, dans notre expérience, que l'augmentation du nombre général de micro-organismes en absence de glucose avait lieu dans les milieux enrichis de matière sèche des extraits, et non d'extraits eux-mêmes. Etant donné que: 1) nous nous servions dans nos observations d'un milieu standard, 2) les colonies sont plus grandes et plus faciles à compter en présence de glucose, 3) en présence de glucose l'action favorable des extraits de tourbes se manifeste nettement — on se servait dans les recherches détaillées des milieux contenant 1 p. 100 de glucose. Actuellement il y a cependant des données selon lesquelles cette concentration est trop forte pour certains micro-organismes de tourbes et qu'elle devrait être réduite à 0,5 p. 100.

Dans la majorité d'expériments les boîtes de Petri étaient incubées à 28°C ou à 25°C et une partie à 2°C. On a remarqué que les micro-organismes aptes à se développer à 2°C, se développent aussi bien dans les températures plus élevées, inférieures toutefois à 30°C. Par contre, c'est seulement un nombre infime de germes cultivés à l'étuve, qui sont aptes à se développer en 2°C. Donc la température de 2°C devrait être employée dans les recherches sur des groupes spéciaux de micro-organismes, peu exigeant au point de vue termique. La température entre 25°C et 30°C est la plus juste dans toutes les recherches qui attachent d'importance à la vitesse de croissance. La température de 20°C, et même inférieure, est la plus favorable dans les recherches concernant la masse de croissance. Cette dernière conclusion est basée sur la litérature (Ingraham et Bailey 1959) et sur nos propres observations.

En 1959 apparut, dans les Annales de l'Institut Pasteur, l'étude de Rajka Strunjak intitulée „Influence de la dilution employée sur les résultats de la numération des bactéries du sol par la technique sur planques". L'auteur conclut que les résultats de la numération des bactéries du sol peuvent être considérés comme copétants seulement à condition d'être complétés par une description exacte de la technique adoptée et par les données sur les dilutions employées. Cette opinion est absolument juste. Ce n'est que la technique employée par l'auteur qui nous semble douteuse. Selon cette technique il obtenait des valeurs plusieurs fois plus élevées si la numération des bactéries par 1 g de matière sèche était basée sur des grandes dilutions. La technique de numération, mise au point par nous-mêmes, nous a permis d'éviter de telles erreurs.

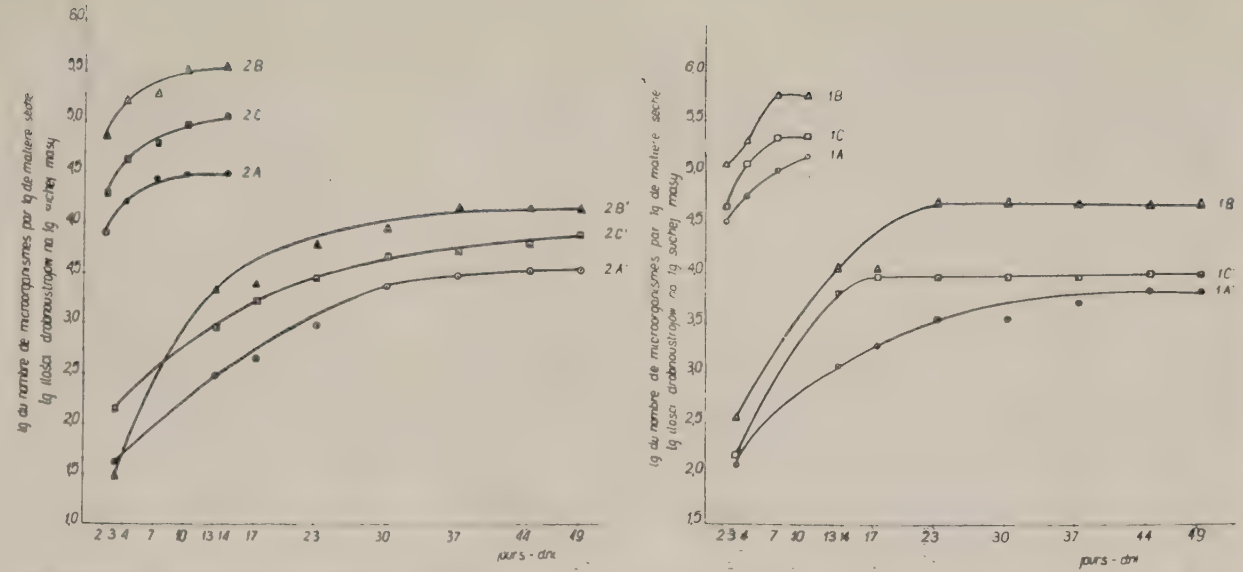


Diagramme II, Diagramme III. Effet de l'extrait et de la matière seche de l'extrait de la tourbe structurale et de la tourbe pulvérulente sur le nombre de micro-organismes. Saison de printemps. L'extrait et la matière sèche stérilisés par la chaleur.

Wykres II, Wykres III. Wpływ wyciągu i suchej masy wyciągu z torfu strukturalnego i rozpylonego na ilość mikroorganizmów. Sezon wiosenny. Wyciąg i sucha masa sterylizowane w wysokiej temperaturze.

Tourbe structurale — 1 **Tourbe pulvérulente — 2.**

1 A, 2 A — milieu standard enrichi de glucose et de sels. Temp. 25°C.
1 A', 2 A' — c. f. Temp. 1,8 - 3,9°C.
1 B, 2 B — milieu de culture avec l'extrait de torbe enrichi de glucose et de sels. Temp. 25°C.
1 B', 2 B' — c. f. Temp. 1,8 - 3,9°C.
1 C, 2 C — milieu de culture avec matière seche de l'extrait de tourbe, enrichi de glucose et de sels. Temp. 25°C.
1 C', 2 C' — c. f. Temp. 1,8 - 3,9°C.

Torf strukturalny — 1 **Torf rozpylony — 2**

1 A, 2 A — pożywka kontrolna z glukozą i z solami. Temp. 25°.
1 A', 2 A' — jak wyżej. Temp. 1,8 - 3,9°.
1 B, 2 B — pożywka z wyciągiem torfowym uzupełniona glukozą i solami. Temp. 25°.
1 B', 2 B' — jak wyżej. Temp. 1,8 - 3,9°.
1 C, 2 C — pożywka z suchą masą z wyciągu torfowego uzupełniona glukozą i solami. Temp. 25°.
1 C', 2 C' — jak wyżej. Temp. 1,8 - 3,9°.

RÉSUMÉ

On a mis au point la méthode des recherches microbiologiques au sujet des substances actives des extraits de tourbes.

On a comparé entre eux les extraits de tourbes imbibées et les extraits naturels, au point de vue leur qualité stimulant le développement microbien; on a analysé les effets du *pH* et les effets de la composition des milieux de culture sur la croissance de microflore; on a déterminé l'effet de l'intervalle entre la prise des échantillons et l'ensemencement sur le nombre général de micro-organismes.

On a mis au point la technique de déterminer le nombre général de micro-organismes, technique qui permet d'éviter les essentiels écarts numériques à l'emploi de différentes dilutions. On a présenté le développement microbien dans des différentes températures.

K. Bassalik, L. Janota-Bassalik, C. Olczyk i *H. Halweg*

METODY MIKROBIOLOGICZNE OZNACZANIA WPŁYWU SUBSTANCJI CZYNNYCH WYCIĄGÓW TORFOWYCH

Streszczenie

W pracy niniejszej opracowano metody badań mikrobiologicznych nad substancjami czynnymi wyciągów torfowych.

Porównano pod względem aktywności stymulującej rozwój mikroorganizmów, wyciągi otrzymane z torfu podsiąkanego i wyciągi naturalne; zbadano wpływ *pH* i wpływ składu pożywki na rozwój mikroflory. Określono wpływ długości okresu pomiędzy pobraniem próbki a szczepieniem na ogólną ilość mikroorganizmów.

Opracowano technikę określania ogólnej ilości mikroorganizmów, technikę, która pozwala na uniknięcie odchyleń ilościowych przy zastosowaniu różnych rozcieńczeń. Przedstawiono rozwój mikroorganizmów w różnych temperaturach.

BIBLIOGRAPHIE

Bassalik K., Janota-Bassalik L., Niewiarowska J., Olczyk C., 1957: Badania nad wpływem nieznanych związków organicznych na urodzajność torfowisk meliorowanych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, **10**: 121.

Bottomley W. B., 1920: The growth of Lemna plants in mineral solutions and in their natural medium. *Ann. Bot.*, **34**: 345.

Bottomley W. B., 1920: The effect of organic matter on the growth of various water plants in culture solution. *Ann. Bot.*, **34**: 353.

Ingraham J. L., Bailey G. F., 1959: Comparative study of effect of temperature on psychrophilic and mesophilic bacteria. *J. Bact.*, **77**: 609.

Lochhead A. G., Burton M. O., 1953: An essential bacterial growth factor produced by microbial synthesis. *Canad. J. Bot.*, **31**: 7.

Lochhead A. G., 1958: Soil bacteria and growth-promoting substances. *Bact. Rev.*, **22**: 145.

Norman J., 1958: Soil extract in soil microbiology. *Canad. J. Microbiol.*, **4**: 363.
Strunjak Rajka, 1959: Influence de la dilution employee sur les resultats de la numération des bactéries du sol par la technique sur planques. *Ann. Inst. Pasteur.* **97**: 259.

Tableau I

Développement de la microflore des tourbes dans des milieux de culture avec et sans glucose. Nombre de micro-organismes en millions sur 1 g de matière sèche de tourbe (l'incubation dans la température de 25°C, pendant 10-14 jours)
Rozwój mikroflory torfów na pożywkach zawierających glukozę lub bez glukozy. Ilość mikroorganizmów w milionach na 1 g suchej masy torfu (hodowle w temperaturze 25° podczas 10-14 dni)

Tourbe	Mai				Novembre			
	Extrait		Matière sèche d'extrait		Extrait		Matière sèche d'extrait	
	B 1 % de glucose	b sans glucose	C 1 % de glucose	c sans glucose	B 1 % de glucose	b sans glucose	C 1 % de glucose	c sans glucose
structurale Nombre de micro-organismes	550	409	223	635	217	263	86	169
%	100	74,4	100	284,8	100	121,2	100	196,5
pulvérulente Nombre de micro-organismes	357	332	116	260	342	328	122	219
%	100	93	100	224	100	96	100	179,5

Remarque: les milieux de culture stérilisés: en mai par la chaleur, en novembre par l'oxyde d'ethylène.
Uwaga: pożywki sterylizowano: w maju — temperaturą, w listopadzie — tlenkiem etylenu.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 315—329

K. Obojska

FOSFOMONOESTERAZY W PRĄTKACH KWASOOPORNYCH

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie

Wpłynęło dnia 29 marca 1959 r.

WSTĘP

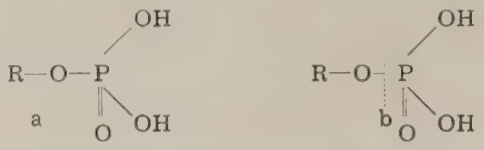
Fosfatazy zostały odkryte w 1907 r. przez badaczy japońskich. Suzuki. Yoehimura i Takaishi i zauważyli, że w otrębach ryżowych i pszenicznych znajduje się enzym, który uwalnia z fityny kwas fosforowy i inozytol. Obecnie znanych jest około 20 różnych fosfataz. Grają one znaczną rolę w metabolizmie węglowodanów, nukleotydów i fosfolipidów oraz w procesach fizjopatologicznych.

FOSFATAZY W PRĄTKACH KWASOOPORNYCH

Badania nad fosfatazami bakteryjnymi zapoczątkował Stoklasa (1911) (cyt. wg Portera 1950). Toda (1930) oraz Toda i Urabe (1935) stwierdzili występowanie cholinofosfolecytynazy u następujących szczepów *Mycobacterium tuberculosis: var. leprae, var. avium, var. murium, var. bovis, var. hominis*, wysuwając hipotezę, że wirulentność ich w stosunku do organizmu ludzkiego zmniejsza się w miarę wzrostu aktywności cholinofosfolecytynazy zawartej w danym szczepie. Kawabata (1934) wykazał obecność glicerofosfatazy u prątków gruźlicy ludzkiej i bydlęcej. Kwapiński (1948) oznaczył aktywność betaglicerofosfatazy w nienaruszonych komórkach szczepów prątków saprofitycznych, gruźlicy zwierząt zimnokrwistych, myszy, ptaków i ludzi.

DYNAMIKA FOSFATAZ I MECHANIZM ICH DZIAŁANIA

Ogólnie przypuszczano, że fosfatazy hydrolizują lub syntetyzują następujące wiązania fosforanowe:



Prace ostatnich lat (A x e l r o d 1956) dowodzą, że lityczny rozpad wiązania z grupą fosforanową istotnie następuje w miejscu *a* lub *b*. Przy rozpadzie wiązania w miejscu *a* uwalnia się grupa fosforanowa, jeżeli wiązanie rozpada się w punkcie *b* odczepia się grupa fosforylowa. Termin fosfataza odpowiada ogólnie funkcji hydrolitycznego rozkładania estrów według typu *a* i *b*. Na podstawie prac przeprowadzonych przy użyciu izotopów promieniotwórczych ustala się obecnie pogląd, że właściwą funkcją fosfataz jest odczepianie grup fosforylowych i przenoszenie ich na odpowiednie akceptory.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Celem niniejszej pracy jest:

1. Opracowanie najlepszej metody otrzymywania aktywnych preparatów fosfataz z poszczególnych szczepów mykobakterii.
2. Przebadanie aktywności otrzymanych preparatów bakteryjnych zależnie od rodzaju stosowanych substratów, oraz od *pH* środowiska reakcji.
3. Porównanie aktywności fosfataz prątków chorobotwórczych i saprofitycznych.

Aby cel ten osiągnąć starano się o nagromadzenie znacznej ilości fosfataz w komórce przez sporządzenie podłoża z zawartością estrów fosforowych, jako dodatkowego źródła węgla i fosforu. Kontrolowano nagromadzenie w komórce bakteryjnej enzymu, dążąc, by masa bakteryjna użyta do otrzymywania preparatów enzymatycznych zawierała możliwie jak największą ilość fosfataz.

MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY

Materiał doświadczalny stanowiły szczepy mykobakterii otrzymane z Pracowni Bakteriologicznej Instytutu Gruźlicy w Warszawie.

Nazwa szczepu	Źródło pochodzenia
Mycobacterium Kirchberg (*var. avium*)	Ze Státni Zdravotni Ústav
Mycobacterium Wells (*var. murinus*)	Praha, doc. Šula
Mycobacterium smegmatis (2/44)	
Mycobacterium Kraków (*var. avium*)	wyizolowany przez prof. Ślopka w Krakowie

PODŁOŻE — ORYGINALNE I ZMODYFIKOWANE

Bakterie hodowano w oryginalnym płynnym podłożu Sautona w temperaturze 38°. Początkowo podłoże Sautona zmodyfikowano, dając zamiast asparaginy 5 ml trypsynowo-papainowego hydrolizatu na 1 litr pożywki i zamiast 60 ml — 40 ml glicerolu i 1 g glicerofosforanu sodu. *pH* podłoża wynosiło 7,2. W związku ze słabym wzrostem większości szczepów na podłożach zmodyfikowanych, powrócono po parumiesięcznych próbach ponownie do oryginalnego podłoża Sautona, które stosowano przez cały czas pracy.

WYNIKI

WYKRYWANIE CYTOCHEMICZNE FOSFATAZ METODĄ GOMORIEGO

Metodę Gomoriego stosowano w celu wykazania u jakiego szczepu i po jakim czasie inkubacji występuje największe nagromadzenie, lub największa aktywność enzymów fosforolitycznych w komórce.

Bakterie, po inkubacji na podłożu Sautona, zawieszano w wodzie destylowanej i natychmiast sporządzano preparat na szkiełku podstawowym, suszono na powietrzu i utrwalano acetonem przez 15 minut, preparat płukano wodą destylowaną, następnie umieszczano w buforze cytrynianowym o *pH* 4,7 na 10 minut. Po wyjęciu z buforu płukano ponownie przez 60 minut. Przy oznaczaniu fosfatazy alkalicznej w komórkach mykobakterii inkubowano preparat 14-16 godzin w glicerofosforanie sodu o odpowiednim stężeniu. Po wyjęciu i starannym wypłukaniu preparat umieszczano na 3 minut w azotynie kobaltu. Przy oznaczaniu fosfatazy kwaśnej do mieszaniny buforu i substratu (glicerofosforan sodu) dodawano azotynu ołowiu i preparat pozostawiano w mieszaninie przez 16 godzin. Oba rodzaje preparatów po wyjęciu z substratów i starannych wypłukaniu, zanurzano na 2-3 minuty w świeżo sporządzonym siarczku amonu (1 ml nasyconego roztworu siarczku rozpuszczano w 50 ml wody destylowanej).

Występowanie fosfatazy kwaśnej i alkalicznej u poszczególnych szczepów posiadanych mykobakterii przedstawia tablica I. Preparaty bakteryjne na tabeli powiększono około 1800 razy.

Z przeprowadzonych *in situ* oznaczeń metodą Gomoriego wynika, że: 1) Ilość enzymów w komórkach bakteryjnych narasta z wiekiem hodowli, 2) Najkorzystniej jest pobierać bakterie (oprócz *M. smegmatis*) do izolowania fosfatazy między 27 a 30 dniem ich wzrostu na podłożu.

OZNACZENIA AKTYWNOŚCI FOSFATAZ

Do badań zastosowano następujące substraty:

1. Betaglicerofosforan sodu firmy Boots Pure Drug Co. Limited. Nottingham, England.

2. Glicerofosforan sodu firmy Eastman-Kodak.

Alfa glicerofosforan jest tylko w minimalnym stopniu rozkładany przez preparaty z mykobakterii i w związku z tym przestano używać do badań aktywności preparatu Eastman-Kodak Co., złożonego w 52% z formy alfa i 48% z formy beta, a do dalszych badań zastosowano preparat beta.

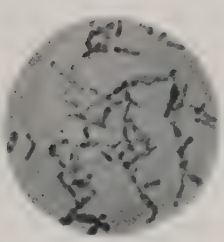
3. Dwupotasową sól glukozo-1-fosforanu (ester Corrich), zsyntetyzowaną wg przepisów **Balla i Cantera** (1952) oraz **Taubera** (1950).

Tabela I

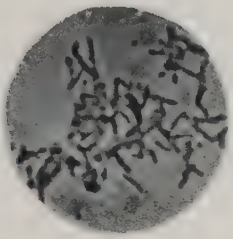
Enzymatyczny rozkład estrów fosforanowych przez preparaty mykobakterii
Enzymic decomposition of phosphate esters by mycobacteria preparations

	Szczep Strain	Preparat Preparation	Substrat	*pH*	Aktywność względna Relative activity	Azot amínowy % NH_2 — nitrogen %
1.	*Mycobacterium smegmatis*	acetonowy	0,1 M β - G	9,7	1,6	11,34
2.		4 rozpuszczalniki	„	9,7	1,2	10,80
3.		autolizat	„	9,7	0,6	9,24
4.		mokra masa	„	9,7	0,34	11,80
5.		4 rozpuszczalniki	„	5,6	1,59	10,80
6.		acetonowy	„	5,6	0,75	11,34
7.		mokra masa	„	5,6	0,3	13,70
8.		mokra masa	0,1 M α+β G	9,7	0,54	13,70
9.		autolizat trypsynowy	„	9,7	0,28	8,54
10.		mokra masa	„	9,7	0,275	13,70
11.		autolizat	EC 0,02 M	9,7	0,20	9,24
12.		4 rozpuszczalniki	„	9,7	1,3	10,80
13.		mokra masa	„	9,7	1,17	13,70
14.		acetonowy	„	9,7	0,75	11,34
15.		autolizat	„	9,7	0,217	9,24
16.		mokra masa	„	5,6	1,0	13,70
17.		4 rozpuszczalniki	„	5,6	0,7	10,80
18.		acetonowy	„	5,6	0,7	11,34
19.	*Mycobacterium Kirchberg*	acetonowy	β-G 0,1 M	9,7	1,5	10,50
20.		autolizat	„	9,7	0,7	9,54
21.		mokra masa	„	5,6	1,0	12,34
22.		acetonowy	„	5,6	0,75	11,34
23.		mokra masa	EC 0,02 M	9,7	1,9	12,34
24.		acetonowy	„	9,7	1,75	10,50
25.		autolizat trypsynowy	„	9,7	0,60	7,49
26.		mokra masa	„	5,6	1,55	13,34
27.		autolizat trypsynowy	„	5,6	0,8	7,49
28.		acetonowy	„	5,6	0,75	10,50
29.	*Mycobacterium Wells*	mokra masa	β-G 0,1 M	9,7	1,3	12,94
30.		mokra masa	EC 0,02 M	9,7	0,5	12,94
31.		mokra masa	„	5,6	0,6	12,94
32.	*Mycobacterium Kraków*	mokra masa	β-G 0,1 M	9,7	0,27	11,54
33.		mokra masa	EC 0,02 M	9,7	0,8	11,54

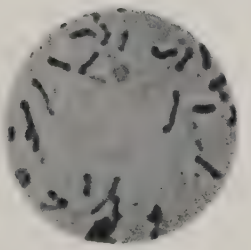
Uwaga: β - G—β - glicerofosforan
Note: α - G—α - glicerofosforan
EC— ester Cori



Fot. 1 — kwaśna fosfataza, 7 dzień hodowli
Phot. 1 — acid phosphatase, 7 days culture

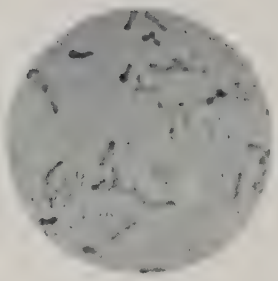


Fot. 2. — zasadowa fosfataza, 7 dzień hodowli
Phot. 2 — alkaline phosphatase, 7 days culture

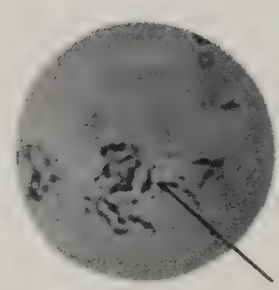


Fot. 3 — kwaśna fosfataza, 14 dzień hodowli
Phot. 3 — acid phosphatase, 14 days culture

Odczyn Gomoriego, *Mycobacterium Wells*
Gomoris test, *Mycobacterium* Wells

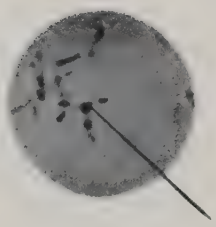


Fot. 4 — zasadowa fosfataza, 14 dzień hodowli
Phot. 4 — alkaline phosphatase, 14 days culture



Fot. 5 — kwaśna fosfataza, 15 dzień hodowli
Phot. 5 — acid phosphatase, 15 days culture

PbS



Fot. 6 — zasadowa fosfataza, 21 dzień hodowli
Phot. 6 — alkaline phosphatase, 21 days culture

CoS

Bakterie hodowano na podłożu Sautona
Bacilli cultivated in Sauton's medium

4. Fosfofenolftaleinian sodu wypreparowany wg przepisu Fishmana i współpracowników (1948) oraz Huggnisa i współpracowników (1945).

5. Fenylofosforan dwusodowy firmy Theodor Schuchardt, München.

Przed użyciem do badań poddano substraty kontroli na obecność wolnych anionów PO_4, wolnej fenolftaleiny, wolnego fenolu oraz jednorodności substratów węglowodanowych.

Testy prowadzone w celu wykrycia zanieczyszczeń w substratach dały wyniki negatywne. Jednorodność estrów fosforanowych przebadano metodą chromatograficzną. Chromatogramy rozwijano w układzie n-butanol: kwas pikrynowy: woda (80 ml-4 g — 20 ml). W toku pracy zauważono, że hydrolizę estrów fosforanowych na bibule korzystniej jest prowadzić przez naświetlanie lampą rtęciową niż zwykłymi metodami, ponieważ chromatogram nie czernieje, a bibuła nie ulega zniszczeniu. Chromatogramy wywoływano odczynnikiem Hanesa Isherwooda. Po wysuszeniu naświetlano lampą kwarcową firmy Kwarc-Bonn i obserwowano niebieskie plamy zhydrolizowanych estrów.

OTRZYMYWANIE CZYNNYCH PREPARATÓW FOSFATAZ

Mokra masa bakteryjna. Hodowlę bakteryjną w okresie maksymalnego nagromadzania enzymu (tabela I) odsączano od podłoża przy pomocy filtru Seitza i przemywano kilkakrotnie wodą destylowaną. Masę bakteryjną przechowywano 12 godzin w temperaturze pokojowej w celu lepszego wyschnięcia. Do doświadczeń pobierano 1 g przygotowanej masy bakteryjnej.

Preparaty acetonowe. Bakterie oddzielone od podłoża i starannie przepłukane wodą destylowaną zadawano bezwodnym acetonem, oziębionym do -15 - -18°. Szybko wirowano przez 3 - 5 minut przy 3500 obrotach na minutę, aceton zlewano i całą czynność powtarzano dopóty, dopóki aceton nad masą bakteryjną nie był zupełnie bezbarwny. Po zdekantowaniu ostatniej porcji, bakterie suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w eksykatorze nad chlorkiem wapnia w temperaturze pokojowej. Starannie przesuszoną masę bakteryjną można przechowywać w eksykatorze w 4° w ciągu miesięcy bez uchwytnego spadku aktywnośc: enzymatycznej.

Preparaty sporządzone przy pomocy innych rozpuszczalników. Podobne proszki otrzymano stosując inne rozpuszczalniki oziębione do tej samej temperatury. Bakterie po odsączeniu od podłoża przemywano mieszaniną następujących rozpuszczalników: 1) Mieszaniną alkoholu etylowego, metanolu, eteru etylowego w stosunku 2 : 1 : 2, 2) chloroformem, 3) acetonem. Masę bakteryjną przemywano kilkakrotnie każdym rozpuszczalnikiem, a proszek bakteryjny suszono dalej jak w przypadku bakterii przemywanych acetonem.

Autolizaty bakteryjne. Podstawą zastosowania autolizatów w celu otrzymania preparatów fosfataz bakteryjnych były obserwacje poczynione przez Hearda i Wynne (1933), którzy zauważyli, że w fazie rozpadu komórek (*Clostridium acetobutylicum*) wzrasta aktywność fosfatazy w podłożu. Toluenowe autolizaty komórek drożdżowych stosowali też z pomyślnym wynikiem dla wypreparowania fosfataz Schäffner i Krumey (1938).

W niniejszej pracy zastosowano metodę autolizowania wg Albersa (1935). Bakterie, odtłuszczone przy pomocy acetonu, zalewano wodą destylowaną, zawierającą 25% (w stosunku do wagi bakterii) bezwodnego acetonu. Gdy do autolizowania brano mokrą masę bakteryjną, wówczas dodawano 2-2,5 razy więcej wody w stosunku wagowym. Po wymieszaniu całości dodawano 10% objętościowych toluenu i octanu etylu w stosunku 1 : 1. Bakterie zmieszane z wodą, octanem etylu i toluenem, autolizowano i proces autolizy kontrolowano mikroskopowo.

Autolizaty komórkowe trawione trypsyną. Proces ten opiera się na doświadczeniach Ehrenwarda (1933), który wykazał, że fosfataza alkaliczna z nerki nie traci aktywności pod wpływem trawienia trypsyną (cyt. wg Abul-Fadla i Kinga 1945). Kutschner i Panny (1938) donieśli, że kwaśna fosfataza nerkowa odporna jest na działanie papainy.

W niniejszej pracy autolizat komórkowy poddano działaniu 0,1% trypsyny w ciągu 2 godzin w buforze weronalowym o *pH* 8,6 w 37°. Trypsynę usuwano z autolizatu wytrząsając go pół godziny z kaolinem o ziarnie 0,60 mm, dodanym w ilości 4% w stosunku wagowym. Kaolin usuwano następnie z autolizatu przez odsączenie. Przesącz kontrolowano na obecność trypsyny przy pomocy elektroforezy bibułowej.

Ekstrakcja mocznikiem białka bakteryjnego. Mocznik w preparatyce drobnoustrojów stosowano w celu izolowania kwasów nukleinowych z bakterii i bakteriofagów oraz dla otrzymywania immunologicznie czynnych białek z prątków gruźliczych.

Ekstrakcję mykobakterii prowadzono wg Seibert i Fabrizio (1952) oraz Baldwina i współpracowników (1953). Ekstrakt mocznikowy sączono przez filtr Seitza, poddawano dializie przez specjalnie spreparowaną błonę celofanową przez 2 godziny w temperaturze 4°, rozcieńczano następnie wodą w stosunku 1 : 1. Aktywność ekstraktów mocznikowych badano po 1-, 1,5- i 2-godzinnej dializie w wodzie destylowanej w temperaturze 4°.

Ekstrakty były nieaktywne w stosunku do stosowanych w niniejszej pracy substratów. Wykonano elektroforezę bibułową otrzymanych ekstraktów. Ekstrakt mocznikowy *M. smegmatis* składał się prawie wyłącznie z kwasów nukleinowych.

Fosfatazy bakteryjne znane są jako enzymy nie dyfundujące do podłoża, jeżeli komórki nie weszły w stadium autolizy. W celu wykrycia obecności białka w podłożu, niezagęszczony przesącz z hodowli bakteryjnej analizowano. Obecność niewielkich ilości białka stwierdzono dopiero wówczas, gdy przesącz zadano zakwaszonym acetonem lub kwasem trójchlorooctowym.

METODA OZNACZANIA AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ PREPARATÓW BAKTERYJNYCH FOSFATAZ

Próbka, w której inkubowano substrat zawierała:

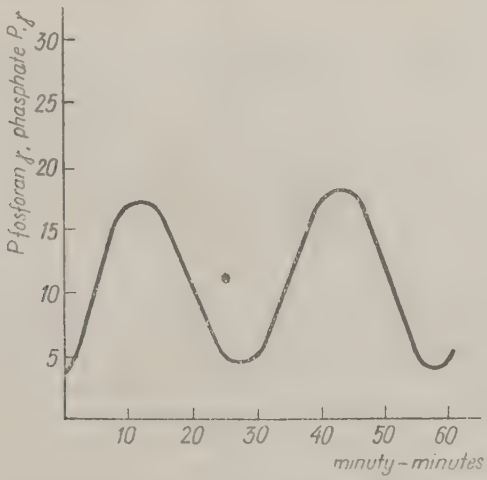
1 ml buforu o odpowiednim *pH*
1 ml wody redestylowanej z aparatu szklanego Schott-Jena
0,5 ml substratu
250 mg bakterii lub 0,25 ml autolizatu bakteryjnego.

Jeżeli do badań używano preparatów acetonowych lub preparatów otrzymanych przy użyciu innych rozpuszczalników, wówczas dodawano je w ilości 0,063 g. Próbkę po reakcji odbiałczano przez dodanie 0,25 ml 20-procentowego kwasu trójchlorooctowego. Sączono, a następnie zobojętniano przez dodanie 0,3 ml 20-procentowego węglanu sodu. *pH* próbki około 8. Przesącz ten pobierano do ilościowych oznaczeń fosforu. Łącznie z próbami badanymi nastawiano próby kontrolne o identycznym składzie, lecz bez substratu lub bez preparatu enzymatycznego. Trzecią próbę kontrolną stanowiła próba normalna, zagotowywana tuż przed inkubacją.

Przy zagotowaniu próby kontrolnej uwalniało się tyle ortofosforanu z komórek bakteryjnych, że niemożliwe było oznaczenie go obraną przez nas metodą. Po inkubacji, odbiałczeniu i zobojętnieniu, każdą próbkę chromatografowano dwukrotnie w układzie rozpuszczalników wg Bandurskiego i Axelroda (1951). Chromatogram pierwszy po wysuszeniu zanurzano w wywoływaczu Hanes-Isherwooda (1949), wywoływano tu anion PO_4. Drugi chromatogram po wysuszeniu wywoływano metodą Wade i Morgana (1953), na obecność estrów fosforanowych. Roztwory nanoszono na chromatogramy ilościowo. Wielkość plam pozostawała w stosunku wprost proporcjonalnym do stężenia substratu. Fosfor w czasie inkubacji oznaczano ilościowo metodą Berenbluma i Chain (1938).

WYNIKI

Początkowo próbki oznaczano przez 1,5 godziny co 1 minutę. Zaobserwowano, że uwalnianie nieorganicznego fosforu w ciągu inkubacji odbywa się niejednostajnie, lecz najczęściej kilkufazowo. Występowanie faz i czas ich trwania zależy przy tym od rodzaju użytego szczepu. Wahania w ilości fosforu nieorganicznego w przesączach, zależnie od czasu trwania inkubacji danego szczepu, są powtarzalne.

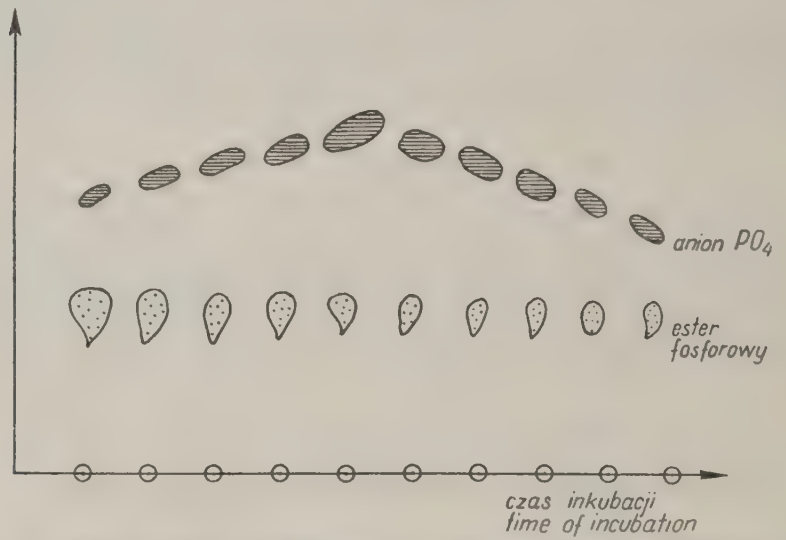


Rys. 1. Rozkład estru Corich 0,02 M przez mokrą masę *Mycobacterium Kirchberg*, przy *pH* 5,6

Fig. 1. Decomposition of Cori ester (0,02 M) by wet mass of *Mycobacterium Kirchberg*, at *pH* 5.6

Jak wynika z powyższego wykresu, ilość fosforu nieorganicznego wzrasta w ciągu inkubacji, osiąga pewne maksimum, a następnie zmniejsza się do poziomu próby kontrolnej, po czym całe zjawisko powtarza się

od nowa, wykazując charakter procesu wielofazowego. Wyniki oznaczeń ujawniające fazowość procesu wykazują zgodność z wynikami analiz chromatograficznych poszczególnych próbek, co jest przedstawione na rysunku 2.



Rys. 2. Rozkład estrów fosforanowych i powstawanie wolnego fosforanu (chromatogram)

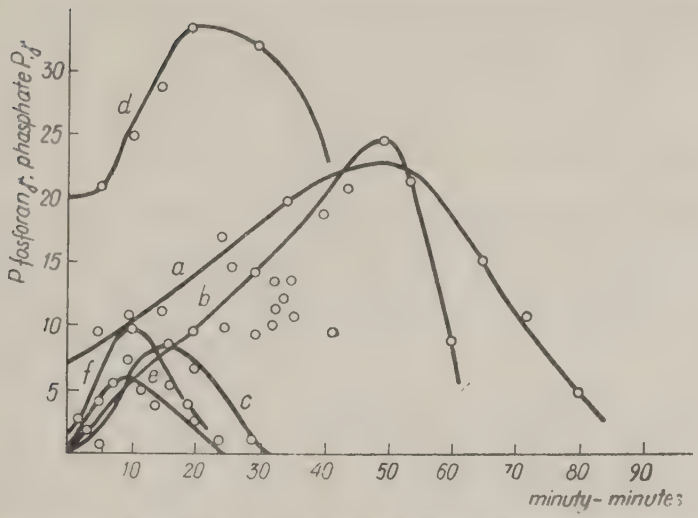
Fig. 2. Decomposition of phosphate esters and evolwing of free phosphates (chromatogram)

Jak wynika z chromatogramu (rys. 2), stężenie substratu maleje jednostajnie do pewnego czasu w ciągu trwania inkubacji i osiąga minimum w punkcie największego wydalania fosforanu nieorganicznego. Następnie, w czasie zmniejszenia ilości wydzielonego fosforanu, ilość substratu nie ulega zmianie, po czym cały cykl powtarza się, poczynając od zmniejszonej ilości substratu, jako punktu wyjściowego. Ilości fosforu estrowego nie oznaczono, sądząc o jego zmianach jedynie na podstawie wielkości plam na chromatogramach.

W świetle tych danych niewyjaśniona pozostaje droga zużytkowania mineralnego fosforanu w zstępujących ramionach obserwowanych krzywych.

Rysunek 3 przedstawia ilości fosforu nieorganicznego, uwolnionego pod wpływem preparatów enzymatycznych w czasie inkubacji substratów.

Tabela I przedstawia enzymatyczny rozkład substratów przez poszczególne preparaty mykobakterii. W celu porównania aktywności fosfataz



Rys. 3. Jedna faza rozkładu estrów fosforanowych różnych substratów pod wpływem preparatów enzymatycznych fosfatazy mykobakterii, krzywa a — 0,1 M beta-glicerofosforan — wilgotna masa *M. smegmatis*, *pH* 5,6, krzywa b — 0,02 M ester Corich — wilgotna masa *M. Wellsa*, *pH* 9,7, krzywa c — 0,02 M ester Corich — autolizat *M. smegmatis*, *pH* 9,7, krzywa d — 0,02 M ester Corich — wilgotna masa *M. Wellsa*, *pH* 5,6, krzywa e — 0,02 M ester Corich — preparat otrzymany z ekstrakcji *M. smegmatis* czterema rozpuszczalnikami przy *pH* 5,6, krzywa f — 0,02 M ester Corich — autolizat trypsynowy *M. Kirchberg*, *pH* 5,6

Fig. 3. One phase of decomposition of different phosphate esters by enzymic preparations from mycobacteria a — 0.1 M β-glicerophosphate, wet bacterial mass of *M. smegmatis*, *pH* 5.6 b — 0.02 M Cori ester, wet bacterial mass, Well's strain, *pH* 9.7, c — 0.02 M Cori ester, autolysate of *M. smegmatis*, *pH* 9.7, d — 0.02 M Cori ester, wet bacterial mass, Cori ester, *pH* 5.6, e — 0.02 M Cori ester, preparation extracted from *M. smegmatis* with four solvents, *pH* 5.6, f — 0.02 M Cori ester, autolysate digested with trypsin of *M. Kirchberg*, *pH* 5.6

badanych preparatów przyjęto za jednostkę aktywność względną. Jako jednostkę aktywności uznano ilość gamma fosforanu nieorganicznego, wydzielonego z substratu przez 250 mg wilgotnej masy komórkowej *Mycobacterium Kirchberg* przy *pH* 5,6 w ciągu 1 minuty w 38°.

Z tabeli I wynika, że rozkład substratów jest silniejszy w środowisku alkalicznym aniżeli w kwaśnym. Największe ilości substratów są rozkładane przez mokrą masę bakteryjną, mniejsze przez preparaty acetonowe. Preparaty otrzymane przy użyciu większej ilości rozpuszczalników dają

również zadowalające wyniki. Podobne wyniki otrzymano stosując autolizaty bakteryjne.

ROZKŁAD FENYLOFOSFORANU

Tabela II

Rozkład fenylofosforanu dwusodowego przez mykobakterie w środowisku alkalicznym przy *pH* 9,7

Decomposition of disodium phenyl-phosphate by mycobacterium at alkaline *pH* 9.7)

Preparat Preparation	Czas oznaczania po: Time of incubation:	0,465 mg związanego fenolu wydzielcno wolnego fenolu amount of free phenol formed from 0.45 mg of phenyl-phosphate	% rozłożonego substraru p. c. of decompesed substrate
Mycobacterium smegmalis — mokra masa	15 minutach	0,100	21,5
	30 „	0,325	69,8
Mycobacterium smegmatis = preparat z 4 rozpuszczalników	15 „	0,060	12,7
	30 „	0,250	53,7
Mycobacterium Kirchberg = preparat acetonowy	15 „	0,210	2,1
	30 „	0,050	10,5
Mycobacterium Kirchberg — preparat z 4 rozpuszczalników	15 „	0,020	4,2
	30 „	0,060	12,6
Mycobacterium Kraków — preparat acetonowy	15 „	0,060	12,62
	30 „	0,150	31,5
Mycobacterium Wells — mokra masa	15 „	0,060	12,6
	30 „	0,280	58,8

Oznaczenie wydzielonego fenolu wykonano wg metody Folina-Ciocalteu w opracowaniu Alporta Noela (1956) na kolorymetrze Pulfricha, w naczynkach o pojemności 2 ml, przy użyciu filtru o długości fali świetlnej 7 200 Å.

Z tabeli II wynika, że fenylofosforan dwusodowy jest rozkładany najsilniej przez *M. smegmatis*, a następnie przez prątek Wellsa. Najmniej aktywny w stosunku do tego substratu okazał się preparat acetonowy i preparat otrzymany przez ekstrakcję czterema rozpuszczalnikami *Mycobacterium Kirchberg*.

ROZKŁAD FOSFOFENOLFTALEINIANU SODU PRZEZ MYKOBAKTERE

Preparat ten może być użyty do badań fosfatazy kwaśnej i alkalicznej. W obu tych środowiskach oznaczano aktywność otrzymanych preparatów bakteryjnych. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że preparat jest rozkładany przez mykobakterie tylko w środowisku kwaśnym (*pH* 5,6). Do badań użyto roztworu 0,006 M, który okazał się zbyt rozcieńczony, aby przy jego użyciu prowadzić oznaczenia wolnej fenolftaleiny w ko-

lorymetrze Pulfricha. Ograniczono się więc do przebadania odpowiedniejszego środowiska rozkładu. Jakkolwiek oznaczenia kolorymetryczne były utrudnione zbyt małym stężeniem fenolftaleiny, ślad różowego zabarwienia był jednak widoczny gołym okiem, przy obserwowaniu grubszej warstwy płynu po jej zalkalizowaniu.

DYSKUSJA

Suszenie masy bakterii w temperaturze pokojowej nie wpływa na aktywność fosfataz w przeciwieństwie do innych enzymów, które w warunkach tych ulegają niekiedy bardzo silnej inaktywacji. Badania przeprowadzone w toku niniejszej pracy wskazują, że takimi samymi właściwościami odznaczają się także fosfatazy otrzymane z komórek prątków kwasoopornych.

Białko autolizatów bakteryjnych stanowi zwykle 10-20% wagi mokrej masy bakteryjnej. Preparaty te rozkładają substrat słabiej niż mokra masa bakteryjna lub preparaty acetonowe tych samych szczepów prątka. Przypuszcza się, że mokra masa i preparaty acetonowe zawierają pewną ilość niespecyficznych fosfataz, przy czym tylko nieliczne z nich znajdują się w postaci czynnej w autolizacie.

Na podkreślenie zasługuje wzrost aktywności enzymatycznej autolizatu po inkubowaniu go z trypsyną. Mogłoby to wskazywać na obecność w nim substancji o charakterze białkowym lub peptydowym, hamujących aktywność fosfataz.

Prócz mokrej masy bakteryjnej, preparatów acetonowych i autolizatów, stosowano preparaty otrzymane przez ekstrakcję mykobakterii rozpuszczalnikami organicznymi oraz mocznikiem. Preparaty uzyskane przez ekstrakcję czterema różnymi rozpuszczalnikami ujawniły znaczne różnice aktywności zależnie od szczepu. Preparaty z *M. smegmatis* wykazały pełną aktywność, sporządzony w tych samych warunkach preparat z *Mycobacterium Kraków*, po zadaniu chloroformem, nie wykazywał śladów aktywności w stosunku do badanych substratów. Różne zachowanie się *Mycobacterium* spowodowane jest prawdopodobnie różnicami składu chemicznego błony komórkowej i cytoplazmy w poszczególnych szczepach, co w znacznym stopniu utrudnia opracowanie jednolitego schematu preparatyki fosfataz i porównywanie ich aktywności. Doświadczenie elektroforetyczne wykonane w przebiegu niniejszej pracy z ekstraktami mocznikowymi potwierdziło istnienie różnic pomiędzy poszczególnymi szczepami.

Zarówno wstępne badania, jak i szczegółowe doświadczenia pozwalają na wysnucie wniosku, że aktywność preparatów enzymatycznych otrzymanych różnymi metodami nie może stanowić dostatecznego kryterium dla klasyfikacji prątków kwasoopornych.

W dalszym ciągu pracy zwrócono więc uwagę raczej na zagadnienie

wpływu metody preparatywnej na aktywność fosfataz oraz na dynamikę katalizowanych przez nie procesów.

Jak wynika z zestawienia względnych aktywności, przedstawionych w tabeli I, nie udaje się wykazać żadnej prawidłowości, nawet w obrębie zbliżonych szczepów. Na przykład *Mycobacterium Kirchberg* różni się znacznie aktywnością od również ptasiego szczepu *Mycobacterium Kraków*.

Aktywność preparatów enzymatycznych wyrażano w umownych jednostkach, opartych nie na procencie zawartości azotu w preparacie, lecz na wadze wysuszonego preparatu oraz ilości odczepionego fosforu nieorganicznego w ciągu określonego czasu inkubacji.

Do układów reagujących nie wprowadzano jonów Mg^{++} w celu zachowania naturalnego, nie wzbogaconego środowiska działania fosfataz.

Metodę Gomoriego stosowano dotychczas jedynie do wykrywania obecności fosfataz w komórkach. W niniejszej pracy zastosowałam ją w celu pozyskania wskazówek dla postępowania przy preparatyce tego enzymu. Wachstein i Pisano (1950), Lassek (1947) oraz Bartelemez i Bensley (1947) przeprowadzili krytyczną ocenę metody Gomoriego wskazując, że może ona dawać fałszywe wyniki wskutek obecności w komórkach pewnych centrów selektywnie adsorbujących ołów z azotynu ołowiu. Nie rozstrzygając słuszności tych poglądów pragnę podkreślić, że wykrycie fosfatazy kwaśnej i alkalicznej, w niniejszej pracy, w komórkach kwasoopornych prątków przy użyciu metody Gomoriego znajduje uzasadnienie w pomiarach aktywności fosfataz w otrzymywanych preparatach enzymatycznych.

Stosując metodę elektroforezy bibułowej nie udało się rozdzielić białka preparatów enzymatycznych na poszczególne frakcje, oddzielono je natomiast od trypsyny w autolizatach trawionych tym enzymem.

Przy obserwowaniu wykresów interesujący jest charakter krzywych zależności między ilością uwolnionego fosforanu nieorganicznego a czasem trwania inkubacji substratów z preparatami enzymatycznymi. Ilość fosforu nieorganicznego początkowo wzrasta, osiąga krótkotrwałe maksimum, a następnie zmniejsza się. Na niektórych wykresach obserwuje się ponowne gromadzenie i znikanie nieorganicznego fosforu. Przeprowadzone wielokrotne doświadczenia stale potwierdzały występowanie tego zjawiska fazowości, lecz nie pozwoliły na jego jednoznaczną interpretację. Badania chromatograficzne wykonywane w okresie inkubacji, przypadającym na zstępujące ramię krzywej, nie doprowadziły do wykrycia powstawania nowych estrów fosforowych, ani narastania stężenia poprzednio istniejących. Pod rozwagę można by było wziąć powstawanie związków fosfo-lipidowych. Preparaty acetonowe z prątków kwasoopornych wysiane na podłoże są bowiem w stanie syntetyzować lipidy błony komórkowej, jeśli

dostarczyć fosforanu. Nie udało się jednak wykazać zwiększonego pobierania fosforu z podłoża przez preparaty acetonowe w fazie syntezy. Prócz tego kompleksy lipidowo-fosforowe powinny być widoczne na chromatogramach bibułowych w miejscu naniesienia próby, czego również nie zaobserwowano. Istnieje prawdopodobieństwo, że fosfor znikający z inkubowanej mieszaniny można byłoby odnaleźć w strącie białkowym. Na korzyść tego poglądu przemawiałyby następujące fakty doświadczalne: 1) Uwalnianie fosforu pod wpływem termicznej koagulacji białka bakteryjnego, 2) Wzrost ilości ortofosforanu w przesączu podczas denaturacji białka bakteryjnego kwasem trójchlorooctowym, proporcjonalny do czasu działania kwasu na białko.

Pewne dane z literatury wykazują, że komórki prątków kwasoopornych gromadzą w obrębie mitochondriów znaczne ilości metafosforanów, co przemawiałoby na korzyść wydzielania jonów fosforu z metafosforanów. Z badań lat ostatnich wynika, że substancja zapasowa — wolutyna, uważana do niedawna za wysoko spolimeryzowane kwasy nukleinowe, stanowi w rzeczywistości zgrupowanie metafosforanów.

Czy istotnie znikający z reagującego układu enzymatyczny ortofosforan ulega przekształceniu w metafosforany związane z białkiem bakteryjnym, oraz czy fosfatazy odgrywają jakąś rolę w tym procesie, nie zostało wyjaśnione.

Opisane wyżej zjawisko fazowych wahań ilości nieorganicznego fosforanu w inkubowanej mieszaninie uniemożliwiało stosowanie jednolitego schematu inkubacji enzymu z substratem, zarówno w stosunku do różnych szczepów, jak i różnych substratów. Wydaje się, że nie uwzględnienie zjawiska fazowości może być źródłem rozbieżności wyników doświadczeń różnych autorów nad dynamiką działania fosfataz.

Wyniki badań nad rozkładem 0,1 M betaglicerofosforanu wskazują na zdecydowanie większą aktywność fosfatazy alkalicznej, podczas gdy Kawabata (1934) i Kwapiński (1948) dochodzą do przeciwnych wniosków.

Toda i Urabe (1935) usystematyzowali prątki kwasooporne na podstawie aktywności zawartej w nich esterazy cholinowej, przy czym podział ten okazał się zgodny z zjadliwością badanych szczepów dla człowieka. Przypuszczenie, że podobny paralelizm może istnieć pomiędzy chorobotwórczością poszczególnych szczepów i aktywnością zawartych w nich fosfataz, nie wydaje się uzasadnione w świetle niniejszej pracy. Niemniej jednak — ze względu na znaczną zawartość organicznych związków fosforowych w komórkach prątków w porównaniu z innymi bakteriami — udział fosfataz w matebolizmie *Mycobacterium* jest większy niż u innych bakterii.

Pragnę podziękować Pani prof. dr Janinie Opieńskiej-Blauth za umożliwienie wykonania niniejszej pracy w Jej Zakładzie, za wskazówki udzielone w czasie wykonywania pracy oraz za cenne uwagi przy opracowywaniu tekstu, a Panu doc. drowi Kańskiemu za cenne wskazówki przy opracowaniu materiału doświadczalnego.

LITERATURA

Abul-Fadl T. M., King J. E., 1949: Purification of alkaline phosphatase by tryptic digestion. *Biochem. J.*, **44**: 434.

Albers H., Albers E., 1935: The phosphatases I. Renal phosphatase. II. *Z. Physiol. Chem.*, **232**: 165.

Albers H., Albers E., 1935: A simple method for preparation of highly active phosphatase from animal material. *Z. Physiol. Chem.*, **232**: 189.

Axelrod B., 1956: Enzymatic phosphate transfer. *Adv. Enzymol.*, **17**: 106.

Baldwin R. W., Gilbert O. A., Iland C. N., Jones S. A., 1953: Specific tubercle antigen extracted from living *M. tuberculosis*. *Biochim. Biophys. Acta*. **10**: 402.

Ball G. E., Canter E. H., 1952: Biochemical preparations. New York.

Bandurski S. R., Axelrod B., 1951: The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. *J. Biol. Chem.*, **193**: 405.

Bartelmez G. W., Bensley S. H., 1947: Acid phosphate reactions in peripheral nerves. *Science*, **106**: 639.

Berenblum J., Chain E., 1938: Studies on the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.*, **32**: 286.

Fishman W. H., Springer B., Brunetti R., 1948: Application of an improved glucoronidase assay method to the study of human blood betaglucoronidase. *J. Biol. Chem.*, **173**: 449.

Hanes F. R. S., Isherwood F. A., 1949: Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. *Nature*, **164**: 1107.

Heard R. D., Wynne A. M., 1933: Studies on bacterial phosphatases. I. The decomposition of fosforic acid esters by *Cl. acetobutylicum* Weizmann. *Biochem. J.*, **27**: 1655.

Huggnis Ch., Talay P., 1945: Sodiumphenolftaleinphosphate as a substrate for phosphatase tests. *J. Biol. Chem.*, **159**: 399.

Kawabata S., 1936: Enzymes of tubercle bacilli. *Chem. Abstr.*, **30**: 8284.

Kutscher W., Pany J., 1938: Prostata phosphatase. *Ztschr. Physiol. Chem.*, **225**: 169.

Kwapiński J., 1948: Badania nad enzymami prątków kwasoopornych. *Gruźlica*, **16**: 159.

Lassek A., 1947: The stainability of so called axonal acid phosphatase as determined by experiments in its „stainability". *Stain. Techn.*, **22**: 133.

Porter J. K., 1950: Bacterial Chemistry and Physiology. New York, John Wiley

Schäffner A., Krumey F., 1938: Über die Phosphatasen der Hefe. *Hoppe Seylers Ztschr.*, **225**: 145.

Seibert F. B., Fabrizio A., 1952: Isolation and chemistry of a protein fraction of *M. tuberculosis*. Its ability to sensitize cells. *Am. Rev. Tuberc.*, **65**: 314.

Tauber H., 1950: The chemistry and technology of enzymes. Philadelphia.

Toda T., 1930: Studien über die Lezithinase der Bakterien und über die Frage der Bakteriolyse der säurefesten Bazillen in der Lezithinemulsion. *Zentr. Bakter.* I. O., **117**: 489.

Toda T., Urabe K., 1936: Biological properties of tubercle bacilli and other nonpathogenic bacilli. *Chem. Abstr.*, **30**: 8286.
Wachstein M., Pisano M. A., 1950: New staining technique for polar bodies. *J. Bact.*, **59**: 357.
Wade H. E., Morgan D. M., 1953: Detection of phosphate esters on paper-chromatograms. *Nature*, **170**: 529.

K. Obojska

PHOSPHOMONOESTERASES IN ACIDFAST MYCOBACTERIA

Summary

The acidic and alkaline phosphatases in *Mycobacterium smegmatis*, *M. Kirchberg, Well's* strain and strain *Kraków* were examined.

Introductory studies were conducted by modified Gomori's method (see table I).

For quantitative enzymic studies bacterial suspensions, acetone preparations, bacterial autolysates and autolysates digested with trypsin were used.

As substrates for enzymic reactions Cori-ester, β-glicerophosphate, mixture of α- and β-glicerophosphates, phenylphosphate and sodium phosphophenylphthaleinate were utilized.

Acidic and alkaline phosphatases were found in all examined strains. The most active enzymic preparations were obtained from *M. smegmatis*.

It was shown that the rate of formation of inorganic phosphate during the incubation of preparations was changing periodically.

Author gives the description of a new method of identifying of phosphate-esters on chromatograms.

The results of the research are illustrated by graphs and tables.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 331—341

M. Bedryńska-Dobek

ÉTUDE COMPARATIVE ENTRE LES SOUCHES DU GENRE *ACTINOBACTERIUM*, *ACTINOMYCES BOVIS* ET *NOCARDIA ASTEROIDES* *

Institut de Microbiologie de l'Académie de Médecine à Poznań

Manuscrit reçu le 16. IX. 1959

Les souches d'*Actinobacterium* — anaérobies strictes, *Actinomyces bovis* — anaérobies facultatives, toutes de la collection du service des „Anaérobies" (chef — prof. dr. A. R. Prévot) ont été étudiées comparativement avec les souches aérobies — *Nocardia asteroides* provenant de la collection du Service de „Physiologie et Mycologie Végétale" (chef — prof. dr. G. Segretain).

Nous savons que toutes ces souches peuvent donner la même image histopatologique. Si on coupe une lésion, on voit la multiplicité des amas noyés au sein de polynucléaires nécrosés et dégénérés et autour des foyers du tissu fibrino-ligneur.

Rosebury *et al.* (1944) a interpreté ces formations rayonnées de massues comme réaction des tissus environnants.

L'image clinique de maladies provoquées par ces trois genres de germes est aussi simile. Il s'agit d'une suppuration aiguë ou subaiguë, devenant rapidemat chronique, avec les tuméfactions de tissu fibro-ligneux et avec les fistules par lesquelles est sécrété le pus. On peut observer dans ce pus les grains risiformes dont la couleur varie du blanc au blanc-jaunâtre suivant les microbes associés. On sait que les microbes associés jouent un rôle considérable dans le développement de ces processus.

Actinobactériose, actinomycose vraie (Prévot 1955b, 1958, Prévot et Mellis 1958) et nocardiose (Eppinger 1890, 1891) sont des ma-

* Les travaux sont effectués aux laboratoires des Services des „Anaérobies" et „Physiologie Végétale et Mycologie" de l'Institut Pasteur — Paris.

ladies graves, cachectisant, lesquelles, si elles ne sont pas bien soignées, aboutissent plus ou moins vite à la mort.

Mais l'évolution et la thérapeutique de chacun de ces groupes de maladies peuvent être différentes. En générale, la nocardiose est moins sensible aux antibiotiques classiques que l'actinobactériose et actinomycose vraie (Mariat 1957b, Prévot et Mellis 1958). Elle donne plus souvent la formation de métastases viscérales, pulmonaires ou cérébrales qui se généralisent aggravant encore le pronostique.

Il est intéressant de comparer des caractères morphologiques, culturaux et biochemiques du pouvoir pathogène et de la résistance aux antibiotiques de ces genres de germes.

MATERIEL ET MÉTHODES

Les souches d'*Actinobacterium* et d'*Actinomyces bovis* provenant de la collection du Service des „Anaérobies" après leurs lyophilisation sont les suivantes:

2 souches d'*Actinobacterium israeli*: nr *1641-A*, nr *1665*
2 „ d'*Actinobacterium abscessum*: nr *1749-B*, nr *10-A*.
1 „ d'*Actinobacterium cellulitis*: nr *1591-B*
1 „ d'*Actinobacterium liquefaciens*: nr *1784*
1 „ d'*Actinobacterium meyeri*: nr *1453*
2 „ d'*Actinomyces bovis*: nr *854-A*, nr *1488*

La souche d'*Actinobacterium* provenant d'isolement récent:

1 „ d'*Actinobacterium israeli*: nr *1997 myc.*

Les numéros des souches de *Nocardia asteroides* sont ceux de la mycothèque du Service de „Mycologie et de Physiologie Végétale" de l'Institut Pasteur.

Nocardia asteroides: nr nr *318, 320, 322, 328, 331, 33, 358, 360.*

Souchs *X-différente*: nr *349**.

La souche *349** présente des caractères morphologiques faisant penser qu'elle est étrangère à l'espèce étudiée.

Nous avons profité dans nos études des anaérobies de technique et de milieux publiés par Lebert et Tardieux (1952). Pour faire la comparaison nous avons également étudié les souches de *N. asteroides* en employant les mêmes techniques et milieux avec de modifications nécessaires pour les aérobies et aussi les techniques publiées par Mariat (1957a, 1958).

Les expériences, les observations, les résultats et les conclusions pour ces groupes de germes sont présentés dans le tableau 1.

Tableau I

L'Étude comparative de *Actinobacterium Actinomyces* et *Nocardia*

	8 souches *Actinobacterium*			2 souches *Actinomyces bovis*			9 souches *Nocardia asteroides*		
Les résultats:	+	+/−	−	+	+/−	−	+	+/−	−
Morphologie									
Description	Batonnets gram+très fréquemment filamentés avec des renflement et des bifurcations						fragmentations de culture vieille		
Dimension	0,7×2-60 μ			0,7×2-20 μ			0,3-0,8×1-10 μ		
Spore			8−			2−	7+		2−
Gram	8+			2+			9+		
Ziehl-Neelsen			8−			2−		9+/−	
Physiologie									
Aérobiose	anaérobiose stricte			anaérobiose facultative			aérobiose stricte		
Thermorésistance	60°—30 sek			60°—1 min.			60°—1 min. 80°—5 min.		
Catalase			8−		2+/−		9+		
Longévité	12-21 jours			30 jours			18-24 mois		
Oxydoréduction: R.N	1+	7+/− faible			2+/− faible			nulle	9−
Vert-Janus, Safranin			8−			2−			9−
Cultures									
Sérum	favorise la culture			favorise la culture			n'est pas nécessaire		
Gélose	base-bouillon VF profonde			inclinée et profonde			inclinée		
Colonies	irrégul,. petite			irrégul., petite			1×1/2 cm, jaune ochre, rouge		
Eau peptonée	5+gram.3+/−trouble				grumaux	2−	9+ voile		
Bouillon glucosé VF	5+gram.3+/− „			2+ „			8+ voile		1−boules
Pouvoir protéolitique									
Gélatine	1+		7−			2−	1+		8−
Lait tournesolé	3+		5−			2−			9−
Proteins coagulés			8−			2−			9−
Glucides									
Lactose	7+		1−	2+	1+/−			3+/−	6−
Saccharose	6+	1+/−	1−	2+			2+	5+/−	2−
Arabinose	6+		2−	2+				6+/−	3−
Maltose	7+	1+/−		2+			1+	8+/−	
Galactose	8+			2+				3+/−	6−
Glucose	7+		1−	1+		1−	9+		
Levulose	7+		1−	2+			8+	1+/−	
Glycérol	8+					2−	8+		1−

	8 souches *Actinobacterium*			2 souches *Actinomyces bovis*			9 souches *Nocardia asteroides*		
Biochimie (cultures du bouillon V. F. gluc. 1%)									
pH final	3-4			3-4			6,2-7,6		
Acidité vol. totale	0,12-0,38			0,48-0,55			0,07-0,15		
Acides volatils	3 acétique, 5 ac.+ formique			2 acétique+formique					9—
Acide lactique	8+					2—	9+		
NH_2(g/100)	0,24-0,27			0,30-0,28			2,6-9,2		
Acetoine	2+		6—	1+		1—			9—
Amines volatiles	5+	2+/—	1—	1+		1—	9+		
Aldéhydes	8+			2+			1+		8—
Alcools	6+		2—	2+			4+		5—
Acétones	5+		3—	2+				1+/—	8—
Phénol, Crésol	2+		6—			2—			9—
Indol, 24 h.			8—		1+/—	1—			9—
SH_2			8—			2—			9—
Nitrate en nitrite			7—	1+	1+/—		7+	1+/—	1—
Uréase			8—			2—	4+	4+/—	1—
Pouvoir pathogène									
Animal expérimental	8 cobayes			2 cobayes			54 souris		
mode d'infection	1 ml de culture+10un. apertase intramuscl.			1 ml de culture+10un. apertase intramuscl.			0,5 ml de culture intrapéritonéale.		
Résultats	6 morts en 14-24 jours sans lésions caracteristiques, 2 sans aucune réaction			2 morts en 15-16 jours sans lésions caractéristiques			31 malades abcès caractéristiques. 23 sans aucune réaction		
Toxines									
0,5 ml de surnageant									
Par vena de queue			8—			2—			9—
Hémolisine	5+	1+/—	2—			2—			9—
Sensibilité aux antibiotiques, met. disque									
Penicilline	4+	4+/—		2+					9—
Streptomycine		2+/—	6—		1+/—	1—			9—
Chloromycétine	6+	2+/—		1+	1+/—			5+/—	4—
Bacytracine	7+	1+/—		1+	1+/—			3+/—	6—
Framycétine			8—			2—		1+/—	8—
Tétracycline	3+	5+/—		1+	1+/—			4+/—	5—
Auréomycine	5+	3+/—		1+	1+/—		1+	1+/—	7—
Terramyycine	1+	7+/—			2+/—		1+		8—
Érytromycine	6+		2—	2+					9—
Spiramycine	5+		3—	2+					9—
Carbomycine	7+		1—	2+				3+/—	9—
Néemycine			8—	1+		1—	1+		8—

MORPHOLOGIE

Ce qui concerne toutes ces souches (*Actinobacterium* — 8, *Ac. bovis* — 2 et *N. asteroides* — 8+1) c'est leur morphologie: les batonnets gram +, très fréquemment filamentés de diamètre variant autour de 0,5μ et de longueur 2 - 60μ, présentent des renflements et des bifurcations. Pour la majorité des souches *Nocardia* les filaments se reduisent au fur et à mesure du vieillissement de la colonie en éléments très courts.

Toutes les souches d'*Actinobacterium*, comme d'*Ac. bovis* ne sont pas du tout acido-résistantes au contraire de *N. asteroides* qui l'est partiellement.

PHYSIOLOGIE

Aérobiose: *Actinobacterium* ce sont des anaérobies strictes toutefois microaérophiles (*A. cellulitis*). Elles poussent dans la gélose dans la zone profonde ou parfois dans la zone critique. *Ac. bovis* sont les anaérobies facultatives, pouvant se développer aussi bien dans la gélose profonde que sur la surface de la gélose inclinée. Les souches de *N. asteroides* sont aérobies strictes poussant sur la surface des milieux solides et liquides.

La thermorésistance de ces germes est intérieure 60° à 0.5-5 min.

La catalase pour les souches anaérobies strictes est négative, elle devient de plus en plus positive à mesure que ces germes sont plus aérobies (*Ac. bovis*). Toutes les souches de *N. asteroïdes* sont très fortement catalase positives. La longévité: En général il y a une grande différence dans la longévité de ces germes. Les souches d'*Actinobacterium* sont mortes entre 12-21 jours, les *Ac. bovis* après 30 jours de culture, mais les souches de *N. asteroides* sont encore vivantes dans 18-24 mois sans repiquage.

L'oxydoréduction: Toutes ces souches ne reduisent ni rouge neutre, ni vert-Janus ni safranine ou très faiblement (*A. meyeri* excepté).

CULTURES

Ce qui diffère beaucoup ces espèces de germes, c'est leurs cultures. Les cultures d'*Actinobacterium* et d'*Ac. bovis* sont favorisées par les serums, mais pour *N. asteroides* ils ne sont pas nécessaires. Ces dernières souches sont beaucoup plus faciles à cultiver et leurs colonies changent selon les milieux (les couleurs: blanc-jaunâtre, ochre, orange, rouge; les consistances: dure, molle; formes: ronde, allongée 0.5-2 cm de diamètre). Celles des anaérobies strictes ou microaérophiles dans les géloses profondes donnent très lentement des colonies de petite taille, de forme variable et de couleur blanchâtre.

En milieux liquides *N. asteroides* poussent sous forme de voile à la surface du milieu. Les *Actinobacterium* se developpent soit en trouble homogène (*A. meyeri, A. abscessum*).

POUVOIR PROTÉOLITIQUE

Ce qui rapproche ces germes c'est leur pouvoir protéolitique. En général elles ne liquéfient pas de gélatine, exception faite seulement *A. liquefaciens,* elles ne modifient pas du lait sauf les souches. *A. liquefaciens* et *A. abscessum.* Les protéines coagulées (serum coagulé, blanc d'oeuf coagulé, foie, cervelle et fibrine) ne sont attaquées par aucun de ces germes.

GLUCIDES

Dans la condition de notre expérience nous avons observé que l'utilisation des substances carbonnées ne s'effectue pas paralellement avec l'acidification du milieu par les souches de *N. asteroides.* Toutefois on peut constater que les *N. asteroides* sont moins actives que d'*Actinobacterium* et d'*Ac. bovis.* Si ces souches fermentent quelques glucides (d-glucose, d-levulose et aussi glycerol) ces résultats ne sont bien lisibles qu'après 30 jours d'étuve. Quand on fait la lecture et la comparaison avec les souches anaérobies après 8 jours, on constate que toutes les souches de *N. asteroides* utilisent seulement avec le changement de *pH* le levulose et le glycerol. Le galactose est fermenté par toutes les souches d'*Actinobacterium* et d'*Ac. bovis*, tandis que les *N. asteroides* ne les fermentent pas. Mais en général on peut dire que les glucides ne permettent pas de caractériser les espèces ni aérobies ni anaérobies étant donné qu'ils sont très lentement et très irrégulièrement fermentés.

BIOCHIMIE

La biochimie a été faite suivant la technique courante (Lebert et Tardieux) modifiée un peu pour les aérobies.

Le *pH* final après 2 semaines d'étuve du bouillon V. F. glucosé 1% en fiole Jaubert et Gory pour les anaérobies est compris entre 3-4 et en fiole de Ferenbach est compris entre 6, 2-7, 6 pour les aérobies.

L'acidité volatile totale pour les *Actinobacterium* et *Ac. bovis* est 0,13-0,55 g/l et varie peu d'une espèce à l'autre. Les souches de *N. asteroides* ne donnent que les quantités d'acide volatile (0,07-0,015 g/l) si faibles qu'on ne peut pas la déterminer ni par la méthode de Duclaux, ni par celle de chromatographie sur le papier. Les souches d'*Actinobacterium* et d'*Ac. bovis* donnent les acides volatiles: acétiques avec quelquefois trace de formique (Dobek 1958).

L'acide lactique fixe est produit par toutes les souches de ces trois genres de germes.

NH_3 a été trouvé dans toutes les cultures d'*Actinobacterium* et d'*Ac. bovis* en 0,24-0,30 g/l. La production d'amoniaque par les souches de *N. asteroides* est plus efficace et elle est representée par les chifres 2,6-9,2 g/l.

Acetoine se trouve très irrégulièrement chez les anaérobies et pas du tout chez les aérobies.

Les amines volatiles chez *Actinobacterium* et *Ac. bovis* sont irrégulièrement positives de même que les alcools, cétones, phénol et indol.

Les couches de *N. asteroides* sont encore moins actives que ces derniers, elles donnent seulement les amines volatiles et parfois des traces d'alcool et de cétone.

Nitrates et nitrites sont reduites par les souches de *N. asteroides* mais très lentement, l'*Ac. bovis* se comportent variablement et les *Actinobacterium* donnent des réactions negatives.

Uréase. Les anaérobies ne produisent pas d'uréase, les aérobis la produisent mais assez irrégulièrement.

POUVOIR PATHOGÈNE

Le pouvoir pathogène des *Actinobacterium* est très difficile de mettre en évidence (Lentze 1942, Mazurek 1954, Prévot 1955a, 1958). Pour rendre les animaux receptifs aux injections de cultures d'*Actinobacterium* il faut préparer le terrain par une lésion aseptique, ischémiante et légèrement nécrosante. P. ex. l'injection préalable de mucine gastrique.

Nous avons essayé d'injecter aux cobays d'abord le hyaluronidase (Appertase) comme agent d'infiltration, par voie intramusculaire, et aussitôt après, au même endroit, une culture pure du germe. La plupart des cobays se cachectisent assez vite et meurent en 2-3 semaines, mais sans produire de lésions caractéristiques (la suppuration nécrotique avec les grains risiformes). Il faut répéter encore l'expérience en prenant le plus grand nombre d'animaux pour assurer les résultats.

Les souches de *N. asteroides* sont expérimentalement pathogènes pour les lapins, pour les cobays et pour les souris. Nous avons fait une expérience sur 54 souris injectées par voie intraperitonéale avec 0,5 ml d'une suspension homogène de culture de 10 jours d'étuve. Nous avons pu constater que la maladie se manifeste par des abcès surtout sur la peritoine, puis sur les autres organes internes (foie, rate, poumon, cerveau, reins). Les resultats — les gravités de la maladie et les lesions des orgenes internes sont variables selons les souches utilisées. Quatre d'entre elles sont très pathogènes, deux le sont moyennement et trois faiblement ou même pas du tout.

TOXINES

Aucune toxine n'a pu être mise en évidence par injection intraveineuse à la souris (18-20 g) de 0,5 ml du surnageant de culture aussi bien chez les *Actinobacterium* que chez les *N. asteroides* et chez les *Ac. bovis*.

Hémolisine. Certaines souches d'*Actinobacterium* (*A. israeli*, *A. liquefaciens*) hémolisent les globules rouges humaines incorporées avec la gélose V. F. glucosée à 0,2%. Aucune souche d'*Ac. bovis* et *N. asteroides* ne produit d'hémolisine sur la gélose inclinée au sang.

SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Pour les anaérobies nous avons réalisé l'antibiogramme par la méthode des disques de Chabbert en boite de Petri anaérobies vis-à-vis de penicilline, streptomycine, chloromycétine, bacytracine, framycétine, auréomycine, tétracycline, terramycine, érytromycine, spiramycine, carbomycine et néomycine. Avec les mêmes antibiotiques nous avons effectué l'antibiogramme en rapport aux *N. asteroides* en employant aussi la méthode de disque de Chabbert pour les aérobies. Ces dernières épreuves ont été realisées deux fois pour confirmation: d'abord sur les milieux solides synthétiques (M a r i a t 1958), puis sur les milieux Sabouraud.

Ces souches sont très peu sensibles aux antibiotiques: une seule est bien inhibée par la terramycine, 5 sont limitées au chloramphénicol, 2 à la bacitricine, 1 à la framycétine, 4 à la tétracycline, 1 à l'auréomycine et 3 à la carbomycine. Toutes les autres souches sont résistantes vis-à-vis des autres antibiotiques. C'est pourquoi on a, en plus, entrepris des essais avec l'I. N. H., P. A. S. et streptomycine au moyen de la méthode de dilution. La sensibilité aux antibiotiques de *N. asteroides* est très faible. Parmi les 15 antibiotiques testés, seuls le chloramphénicol, la bacitracine, la tétracycline et la carbomycine semblent agir sur quelques souches, ainsi que la streptomycine et l'I. N. H. à très hautes doses.

L'antibiotique le plus actif vis-à-vis des souches d'*Actinobacterium* et d'*Ac. bovis* est la penicilline, aucune souche n'a été trouvée penicillino-résistante. Ensuite viennent par ordre décroissant la carbomycine, le chloramphénicol, la bacitracine, l'érytromycine et la spiramycine qui sont également très actifs, mais certaines souches leur sont résistantes. Presque toutes les souches d'*Actinobacterium* étudiées dans ce travail sont insensibles à la streptomycine, la néomycine et la framycétine.

La sensibilité des *Actinobacterium* aux autres antibiotiques est irrégulière (l'auréomycine et la tétracycline).

Aucune souche n'est sensible à tous les antibiotiques.

Aucune souche n'est résistante à tous les antibiotiques. Donc en thérapeutique l'antibiogramme indiquera celui qu'il est préférable d'employer pour guérir les malades.

DISCUSSION

Nos résultats actuels avec la streptomycine sont différents de ceux obtenus par Lentze (1957) qui a constaté que les *Actinobacterium* sont les plus sensibles à la streptomycine. De même, nous avons vu autrefois (Adamski *et al*, 1954, 1955a, 1955b), aussi la grande sensibilité (mais des autres souches d'*Actinobacterium* et d'*Ac. bovis* isolées en Pologne) à cet antibiotique. C'est connu dans la thérapeutique qu'il y a de cas qui sont insensibles à la streptomycine et d'autres qui réagissent parfaitement sur elle.

Les travaux de Boand et Nowak (1949) ont montré qu'après 10 passages de 6 souches d'*Actinobacterium* dans les milieux avec la streptomycine, ces souches au début sensibles, à la fin devinrent complètement résistantes à cet antibiotique.

Il faut noter que Mariat (1957b) eut constaté une action inhibitrice de la 4. 4-diaminodiphenyl-sulfone sur certaines formes d'*Actinomyces* aérobies pathogènes sur les souches de *N. asteroides*. Au contraire, Prévot et Mellis (1958) n'ont vu aucune influence inhibitrice sur les souches d'*Actinobacterium* de cette chimiothérapie. Ils ont constaté que le groupe d'érytromycine est plus efficace envers les *Actinobacterium*.

Nous tenons à remercier ici M. le Prof. A. R. Prévot et M. le Prof. G. Segretain qui nons ont permis de réaliser ce travail dans leurs laboratoires, ainsi que M. Docteur F. Mariat, Mme F. de Cadore et Mlle J. Satre pour leurs très aimable aide.

BIBLIOGRAPHIE

Adamski J., Barańczak Z., Dobek M., Krajnik J., Ziółkiewicz T., 1954: Zachowawcze leczenie promienicy szyjno-twarzowej penicyliną i streptomycyną w oparciu o badania bakteriologiczne. *Czas. Stomatol.*, 8: 2.

Adamski J., Dobek M., 1955a: The sensitivity of strains of A. Wolff-Israeli to some antibiotics *in vitro* tests. *Bull. Soc. Sci. Lettr.*. Poznań, S-C, 5: 3.

Adamski J., Barańczyk Z., Dobek M., Krajnik J., 1956b: Zachowawcze leczenie promienicy szyjno-twarzowej hydrazydem kwasu izonikotynowego i P. A. S. w oparciu o badania bakteriologiczne. *Czas. Stomatol.*, 18: 22.

Boand A., Nowak M., 1949: Sensitivity changes of *Actinomyces bovis* to penicillin and streptomycin. *J. Bact.*, 57: 501.

Dobek M. B., 1958: Détermination du type fermentaire de quelques souches d'*Actinobacterium* par chromatographie sur papier. *Ann. Inst. Pasteur*, 95: 743.

Eppinger H., 1890; 1891: Über eine neue pathogene *Cladothrix* und eine durch sie hervorgerufene Pseudotuberkulose. *Beitr. Pathol. Anat. Pathol.*, 9: 287; 9: 387.

Lebert F., Tardieux P., 1952: Technique d'isolement et de détermination des bactéries anaérobies. *Col. Trav. Pathol. Comp.* Paris.

Lentze F., 1942: Versuche zur Übertragung der Actinomykose des Rindes auf kleine Versuchstiere. *Wiener Freiärztl. Wochenschr.*: 433.

Lentze F., 1957: Zur antibiotischen Terapie der Actionomykose. *Forschr. Kiefer-Gesichtschirurg*, **3**: 306.

Mariat F., 1957a: Les principaux actinomyces aérobies responsables de mycétomes. *Sem. Hop. Paris. P. B.*, **3**: 939.

Mariat F., 1957b: Action *in vitro* de la 4,3 diamino-diphenyl-sulfone sur les actinomycètes aérobies pathogènes. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **244**: 3095.

Mariat F., 1958: Physiologie des actinomycètes aérobies pathogènes. *Mycpathol. Mycolol. Applic.*, **2**: 111.

Mazurek C., 1954: Nouvelles recherches sur la reproduction expérimentale. *Ann. Inst. Pasteur*, **87**: 345.

Prévot A. R., 1957: Manuel de classification et determination des bactéries anaérobies. Paris, Zéme ed.

Prévot A. R., 1955a: Morphologie, physiologie, puvoir pathogène et systématique des actinomycetales anaérobies. *VI Congr. Intern. Microbiol.*, Rome, Symp. *Actinomycetales:* 40.

Prévot A. R., 1955b: Actionbactériose humaine. Des Fiches de Practique Médical., 4 trim.

Prévot A. R., 1958: Biologie des Maladies dues aux anaérobies. éd. Med. Flam. Paris, : 499.

Prévot A. R., Mellis Y., 1958: Étude de la sensibilité *in vitro* d'*Actinobacterium israeli* et d'*Actinobacterium meyeri* à l'oléandromycine. *Ann. Inst. Pasteur*, **95**: 354.

Rosebury T., Epps L., Clark A. R., 1944: A study of the isolation, cultivation and pathogenicity of *Actinomyces israeli* recovered from the human mouth and from actinomycosis in man. *J. inf. Dis.*, **74**: 131.

M. Bedryńska-Dobek

BADANIA PORÓWNAWCZE NAD SZCZEPAMI Z RODZAJU *ACTINOBACTERIUM*, *ACTINOMYCES BOVIS* ORAZ *NOCARDIA ASTEROIDES*

Streszczenie

Przebadano 8 szczepów *Actinobacterium*, 2 *Actinomyces bovis* i 8+1 (nietypowy) *Nocardia asteroides*.

Przy ogólnym podobieństwie morfologicznym (nici gramododatnie polimorficzne z rozgałęzieniami i obrzmieniami na końcach) szczepy *N. asteroides* odróżniały się obecnością kwasoopornych oidii w starszych kulturach. Podstawową cechą fizjologiczną, odróżniającą od siebie te 3 rodzaje, to ich stosunek do tlenu atmosferycznego. Szczepy *Actinobacterium* były bezwzględnymi beztlenowcami, *Ac. bovis* — beztlenowcami względnymi, szczepy *N. asteroides* — bezwzględnymi tlenowcami. Szczepy beztlenowe wymagały podłoży wzbogaconych surowicą (zwłaszcza *A. meyeri*), *N. asteroides* rozwijały się na wszystkich podłożach, najlepiej jednak na podłożu Löwenstein-Jensena. Wrażliwość na podgrzewanie u wszystkich szczepów była duża. Długość przeżycia natomiast najkrótsza u *Actinobacterium* (10-18 dni), nieco dłużej u *Ac. bovis* (30 dni), najdłuższa u *N. asteroides* (około 2 lat). *Actinobacterium* nigdy nie wydzielały katalazy, natomiast szczepy *Ac. bovis* zachowywały się pod tym względem różnie. Peptonizację mleka ściętego wykazywały szczepy *A. abscessus* i *A. liquefaciens;* te ostatnie upłynniały, jako jedyne, żelatynę. Badane szczepy *Actinobacterium* rozkładały większość węglowodanów w podłożach V. F.; *Ac. bovis*

nie atakował glicerolu. Szczepy *N. asteroides* wykazywały znacznie mniejszą aktywność; zużytkowywały jedynie fruktozę, glukozę i glicerol.

We wszystkich hodowlach promieniowców chorobotwórczych stwierdzono obecność kwasu mlekowego (u *N. asteroides* w ilościach 40-krotnie większych) oraz lotnych amin. Szczepy *Actinobacterium* i *Ac. bovis* wytwarzały ponadto kwasy octowy i mrówkowy, aceton, aldehyd i alkohol. W przeciwieństwie do *N. asteroides* nie rozkładały mocznika i nie redukowały azotanów. Hemolizyny wydzielały tylko *A. abscessus*, *A. israeli* i *A. liquefaciens*; innych toksyn żadne z badanych drobnoustrojów nie wydzielały.

Właściwości chorobotwórczych szczepów *Actinobacterium* i *Ac. bovis* nie udało się potwierdzić w badaniach anatomopatologicznych, histopatologicznych i bakteriologicznych, mimo śmierci 8 (na 10 szczepionych domięśniowo) świnek morskich. Właściwości chorobotwórcze szczepów *Nocardia asteroides* wykazano, szczepiąc dootrzewnowo 56 białych myszek 0,5 ml hodowli. Zakażenie objawiało się bakteriemią, obecnością rozsianych ropni na otrzewnej, czasami też na wątrobie, śledzionie i w płucach. Posiewy z ropni i często z niezmienionych makroskopowo nerek i płuc dawały na pożywce Löwenstein-Jensena wzrost szczepów wyjściowych.

Stwierdzono wrażliwość wszystkich beztlenowych promieniowców na penicylinę, większości — na karbomycynę, bacytracynę, erytromycynę i aureomycynę. Spiramycyna, streptomycyna i tetracyklina działały nie na wszystkie szczepy, a framycetyna i neomycyna — na żaden. Szczepy *N. asteroides* okazały się znacznie mniej wrażliwe; tylko 4 antybiotyki wywierały na część spośród nich działanie bakteriostatyczne (chloromycetyna, tetracyklina, bacytracyna i karbomycyna). Badaniem metodą kolejnych rozcieńczeń stwierdzono dodatkowo hamujące działanie streptomycyny i hydrazydu kwasu izonikotynowego, lecz w dawkach bardzo wysokich.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 343—353

M. Bedryńska-Dobek

DÉTERMINATION DES CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES, CULTURAUX ET BIOCHIMIQUES, DU POUVOIR PATHOGÈNE ET DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DE 9 SOUCHES DE *NOCARDIA ASTEROIDES*

Institut de Microbiologie de l'Académie de Médecine à Poznań
Manuscrit reçu le 16. IX. 1959.

Waksman (1918, 1919, 1957) donne un avis autorisé sur la notion d'espèce chez les *Actinomyces* et expose d'autres travaux qui ont été consacrés à ce problème. Il écrit qu'il n'y a pas lieu de créer de nouveaux genres pour les espèces situées à la limite de 2 genres. A l'intérieur de chaque genre peuvent se créer des groupes ou séries d'espèces, comme à l'intérieur des espèces peuvent se rencontrer des variétés différant par des caractères qualitatifs ou quantitatifs. Il affirme que des variations mineures quantitatives ou qualitatives dans les propriétés d'une souche donnée ne peuvent suffire à justifier une espèce nouvelle. Des souches qui n'ont pas la même activité biochimique spécifique mais qui ont les mêmes caractères morphologiques et culturaux ne sont que des variétés. L'emploi de milieux spécifiques dans des conditions standard de culture, l'utilisation d'espèces types valables, devraient faciliter la détermination des actinomycètes.

Mackinnon et Artagaveytia-Allende (1956) ont étudié 38 suches d'actinomycètes isolées de mycétomes, du point de vue morphologique et physiologique: utilisation des substances carbonées et azotées, pouvoir protéolytique. Ils ont examiné l'aspect parasitaire du grain renfermant l'actinomycète *in vivo*. Selon les auteurs, il faut réduire le nombre des espèces valables: ils reconnaissent les espèces suivantes: *Nocardia asteroides*, *N. brasiliensis*, *Streptomyces madurae*, *S. somaliensis* et *S. pelletieri*.

Mariat (1954, 1957, 1958) est arrivé à la même conclusion en étudiant la morphologie et la physiologie de 52 souches d'actinomycètes aérobies pathogènes: *N. asteroides* (12 souches), *N. brasiliensis* (12 souches),

S. madurae (15 souches), *S. pelletieri* (10 souches) et *S. somaliensis* (3 souches). Les actinomycètes aérobies sont, d'après lui, des organismes extrêmement variables en particulier suivant les conditions dans lesquelles ils sont cultivés; ils sont de ce fait difficiles à classer. Cependant, il semble possible, grâce à leurs caractères morphologiques et physiologiques (en particulier études du pouvoir protéolytique, de l'utilisation des divers aliments azotés et carbonés) de discerner une identité spécifique. Certains de ces caractères sont sonstamment stables, d'autres au contraire, ne sont stables que dans les conditions de culture standardisées.

Nous avons étudié quelques souches de *Nocardia asteroides* en cherchant de nouveaux caractères. Nos expériences ont été effectuées pour toutes ces souches dans les mêmes conditions avec lec mêmes méthodes et techniques (techniques du Service de Mycologie et technique de L e b e r t et T a r d i e u x (1952) modifiée). L'étude a porté sur 8 souches de *Nocardia asteroides* et sur une souche aberrante (399), toutes de la collection du Service de Mycologie de l'Institut Pasteur. Les résultats obtenus sont exposés dans les tableaux.

MORPHOLOGIE

Bâtonnets filamenteux polymorphes, ramifiés avec refflement à l'extrêmité des filaments. Dans les vieilles cultures on trouve des éléments coccoïdes et bacilliformes et fréquemment des spores. Les dimensions de

T a b l e a u I

Morphologie et physiologie de *N. asteroides*
Morfologia i fizjologia *N. asteroides*

Nocardia asteroides Souche nr	Morphologie	Dimension longueur × largeur en micron	Spores	Gram	Ziehl-Neelsen bâton	Ziehl-Neelsen spores	Aérobiose stricte	Aérobiose facultative	Catalase	Termorésistence en min/C°	Longévité en mois
318	Bâtonnets filamenteux	5-10×0,3	+	+	−/+	+	+	0	+	1 min., 80°C	24
320	Polymorphes ra-	2-10×0,3	+	+	/	.	.	0	.	1 min., 56°C	24
322	mifiées avec	4-10×0,3	.	−	--	.	+	0	:	1 min., 56°C	18
328	remphlement,	4-10×0,3	.	+		+	:	0	:	1 min., 56°C	18
331	vieilles cul-	5-10×0,3	+	+	−/+	+	+	0	+	1 min., 56°C	20
333	tures frag-	4-10×0,5	+	+	+	+	+	0	+	1 min., 56°C	20
349	mentées en	5-10×0,8	−	+	−	−	0	+	+	5 min., 80°C	24
358	éléments	2-10×0,3	+	+	−/	+	+	0	+	1 min., 56°C	34
360	coccoïdes ou bacilliformes	5-10×0,8	−	+	−	−	+	0	+	5 min., 80°C	24

Nocardia asteroides sont variables de 2 à 60µ de longueur et 0,5-1µ de largeur. Ces souches sont gram-positifs et souvent acido-résistantes. Les spores sont toujours acido-résistantes.

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE DES CULTURES

Milieux liquides: 1° — eau peptonée (classique)
2° — bouillon V. F. (classique)
3° — milieu synthétique: PO_4KH_2 : 0,45 g. — $PO_4Na_2H12H_2O$: : 1,19 g — SO_4Mg7H_2O : 0,60 g — CIK : 1 g — hydrolysat de caséine : 3 g — $PO_4H(NH_4)_2$: . 1 g — glucose : 10 g — sol. d'oligo-éléments X gouttes, thiamine, pyridoxine, amide de l'acide nicotinique $1 : 10^{-7}$ — biotine: $1 : 10^{-9}$ — eau distillée: 1000 g, *pH* 6,8.
4° lait tournesolé.

Chaque milieu est ensemencé sur la surface par un petit fragment de colonie mère obtenue sur le milieu Löwenstein-Jensen. Dans ces milieux liquides les cultures se développent sur la surface, en voile squameux dont la couleur varie du blanc au jaunâtre et au rose. La même souche ensemencée en même temps sur le même milieu dans deux ou trois tubes différents, donne des cultures de couleurs différentes. Les diverses souches (sauf la souche 429) ne se développent au fond des tubes dans le milieu synthétique qu'en présence d'une dose élevée d'I.N.H. qui change leur type respiratoire.

Milieux solides: 1° — gélose glucosée de Sabouraud (classique)
2° — gélose ordinaire
3° — milieu de Löwenstein-Jensen
4° — milieu gélatine synthetique selon Mariat (1947) PO_4KH_2 : : 0,45 g; $PO_4Na_2 12H_2O$: 1,19 g — $SO_4Mg \cdot 7H_2O$: 0,60 g — CIK : 1 g hydrolysat de caséine : 3 g — $PO_4H_2NH_4$: 1 g — glucose : 10 g — solution oligo-éléments : X gouttes — thiamine, pyridoxine, amide de l'acide nicotinique : $1{\cdot}10^{-7}$ — biotine : $1{\cdot}10^{-9}$ — agar : 15 g — gélatine : 4 g — eau distillée 1000 ml.

5° — milieu pomme de terre glycérinée : 200 g pommes de terre, extrait — glycérine : 20 g — PO_4H_2K : 0,54 g — PO_4HNa_2 $12H_2O$: 333 g — gélose : 20 g — eau distillée : 1000 g — *pH* 7,1.

Chaque milieu est ensemencé au centre par un petit morceau de colonie mère. Les cultures sont observées après 7-14 jours d'étuve à la température de 30°C.

Le pouvoir protéolytique est observé sur les milieux Löwenstein-Jensen, lait tournesolé et sur la gélatine. Après incubation et croissance de culture, on peut lire la lyse dans la gélatine en ajoutant sur la surface du milieu le mélange suivant: Cl_2Hg : 15 g — ClH concentré : 20 ml — eau distillée : 1000 ml. La gélatine non altérée précipite en un voile blanc.

Comme on peut le voir sur le tableau 3, les cultures sur les milieux solides sont aussi très variables, leurs couleurs varient du blanc au jaune et à l'orange. Elles sont dures ou molles, très souvent plissées, parfois sur leur surface on observe une poudre blanchâtre de mycélium aérien.

Tableau II

Morphologie des cultures de *N. asteroides* — Morfologia hodowli *N. asteroides*

Nocardia asteroides Souche nr	Eau peptonée croissance faible	Bouillon V. F. croissance bonne	Milieu liquide synth. croissance bonne	Gélose ordinaire croissant assez bonne	Gélose Sabourand croissance bonne	Pomme de terre glicérinée croissance bonne	Milieu Löwenstein-Jensen croissance très bonne
				cultures			
318	voile rose	voile jaune	voile jaune	molle beige	molle crème	molle blanc-orange	molle, plissé jaune
320	voile blanche	voile blanc	voile jaune	dure orange	dure crème	dure blanc-orange	dure jaune
322	voile rose	voile jaune	voile rose	dure beige	dure crème	dure blanc-orange	dure jaune
328	voile rose	voile jaune	voile jaune	molle orange	molle crème	molle blanc-orange	molle jaune
331	voile jaune	voile jaune, rose	voile jaune	molle dure-orange	molle crème	molle jaune	molle orange
333	voile jaune	voile jaune, rose	voile jaune	molle dure-acre	molle crème	molle ocre	molle jaune
349	boules gris	boules grises	boules gris	molle dure-blanc	dure blanc	dure gris-blanc	dure gris-blanche
358	voile rose	voile jaune	voile jaune	dure beige	molle crème	molle blanc-orange	molle jaune
360	voile orange	voile jaune	voile jaune	molle acre	molle jaune	molle blanc-rose	molle rose

C'est sur le milieu Löwenstein-Jensen que *N. asteroides* se développe le mieux, puis ensuite sur le milieu de pomme de terre glycériné, Sabouraud et gélose ordinaire.

PHYSIOLOGIE

Nocardia asteroides se développe bien dans les conditions d'aérobiose stricte (voile sur la surface du milieu liquide). Deux souches (*318, 349*) peuvent aussi se développer en boules au fond des tubes.

La thermorésistance a été faite en chauffant au bain marie à des températures et des temps différents, des ampoules scellées, contenant du milieu synthétique ensemencé avec les diverses souches. La thermorésistance de *N. asteroides* est comprise entre 1 minute, 56°C (7 souches) et 5 minutes 80°C (2 souches). Toutes les souches se caractèrisent par une grande activité catalasique. Aucune d'elles ne réduit le vert-Janus, ni le rouge neutre, ni la phénosafranine.

Ces souches ont une grande longévité variant de 18 mois à plus de 2 ans.

POUVOIR PROTÉOLYTIQUE

Le pouvoir protéolytique est nul pour toutes les souches, sauf la souche aberrante *349*, qui liquéfie la gélatine, coagule et digère le lait et lentement avec alcalinisation (décoloration) du milieu de Löwenstein-Jensen. Le lait n'est pas modifié par 5 souches et il est alcalinisé par 4 d'entre elles.

UTILISATION DES SUBSTANCES CARBONÉES

Ces expériences ont été faites tout d'abord en bouillon V. F. et une seconde fois sur le milieu synthétique. Les milieux chimiquement définis permettent d'obtenir des résultats plus constants et plus nets. On a toujours ensemencé 3 tubes contenant 1% des divers glucides avec une culture de 6 jours de *Nocardia asteroides*. Les résultats ont été lus après 1, 2 et même trois semaines d'étuve de 30°C. On a pris le *pH*, avec l'indicateur universel.

Dans les conditions de notre expérience, on peut observer que l'utilisation des substances carbonées ne s'effectue pas parallèlement à l'acidification du milieu.

En général, on s'aperçoit que les souches utilisent bien le glucose, le levulose et le glycérol, assez bien le mannitol et moyennement le saccharose, le maltose, le lactose, l'amidon, l'arabinose et pas du tout le galactose.

Même quand les glucides sont utilisés, le *pH* du milieu ne varie pas beaucoup: pour ainsi dire aucune modification de *pH* après 2 semaines

Tableau III

Pouvoir protéolytique et utilisation des substances carbonées
Właściwości proteolityczne i wykorzystanie związków węgla

Nocardia asteroides Souche nr	Pouvoir protéolitique		Substances carbonées (utilisation et *pH*																	
			5		6		4		7		8		9		3		10		1		2	
	gélatine	lait tourn.	lactose		saccharose		mannit		amidon		arabinose		maltose		glycérol		galactose		glucose		lévulose	
			u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*	u	*pH*
318	0	alcal	+	6,5	+	7	++	5	+	6	+	6	+	6	++	3	0	7	++	3	++	4
320	0	0	0	7	+	6,5	++	3	0	7	+	6	+	6	++	3	0	7	++	5	++	6
322	0	alcal	0	7	+	6,5	++	5	0	7	+	6	+	6	++	3	0	7	++	3	++	4
328	0	0	+	7	+	7	++	3	0	7	+	6,5	+	6	++	3	+	7	++	5	++	4
331	0	0	+	6,5	+	6,5	++	7	+	6	++	6	+	6	++	3	++	6	++	4	++	4
333	0	0 alcal	++	6	+	6,5	++	5	+	6	++	6,5	+	6	++	3	++	6	++	4	++	4
349	+	coagul digère	++	7	+	6,5	++	7	+	6	0	6,5	+	6	+	6,5	0	7	++	4	++	4
358	0	0	++	7	+	4	+	7	+	7	++	6	+	5	++	3	0	7	++	5	++	4
360	0	alcal	+	7	+	4	+	7	+	6	++	6	++	6	++	3	+	6	++	4	++	4

(*pH* entre 6,8 et 7,4) et après 4 semaines d'étuve on observe des modifications très irrégulières (entre 3 et 7). Mais ces changements de *pH* ne sont pas caractéristiques. Notons cependant que le glycérol qui, après 4 semaines est utilisé par toutes les souches de *N. asteroides*, diminue le *pH* jusqu'à 3.

DOSAGES BIOCHIMIQUES

La biochimie a été faite suivant la technique courante (Mariat 1954) modifiée un peu par nous pour les aérobies.

Après 2 ou même 3 semaines d'étuve, le *pH* final du bouillon V. F. glucosé à 2% ou du milieu synthétique ensemencé par les souches de *N. asteroides* en fiole de Fernbach est compris entre 6,2 et 7,6.

L'acidité volatile totale est très faible: 0,07 à 0,015 et on n'a pas réussi à caractériser les acides produits ni par la méthode de Duclaux ni par chromatographie sur papier, suivant la méthode de Guillaume, Beerens et Osteax (1956) modifiée par Blass (Mariat, 1957).

Tableau IV

Caractères biochimiques de *N. asteroides* — Właściwości biochemiczne *N. asteroides*

Nocardia asteroides Souche nr	Biochimie										
	pH final	Acidité vol. tot. g/1000	Acid lactique	NH_3 g/1000	Acetoin	Amin vol.	Aldéhyd	Alcool	Acéton	Nitrate	Uréase
318	7,2	0,07	+	7,6	−	+	−	−	−	+	+
320	6,2	0,11	+	2,6	−	+	−	−	−	+	−
322	7,2	0,08	+	6,1	−	+	−	+	−	+	+/−
328	7,2	0,08	+	5,4	−	+	−	−	−	+	+/−
331	6,8	0,15	+	5,0	−	+	−	+	−	+	+/−
333	6,2	0,13	+	2,7	−	+	−	+	−	+/−	+
349	7,6	0,08	+	9,2	−	+	+	+	+/−	+	+
358	6,9	0,07	+	4,7	−	+	−	−	−	+	+
360	7,6	0,15	+	9,2	−	+	−	−	−	−	+/−

Les résultats négatifs peuvent provenir du fait que l'utulisation des glucides par les souches de *N. asteroides* n'est pas complète mais s'arrête au stade amino-acides ou bien qu'il y a neutralisation immédiate par les produits alcalins (NH_3, amines volatiles). Ceci doit être vérifié par chromatographie sur papier des acides aminés.

Toutes les souches produisent de l'acide lactique fixe et de l'ammoniaque en grande quantité. Les nitrates sont réduits en nitrites par presque toutes les souches de *N. asteroides*, mais très lentement. Les résultats obtenus sont plus positifs si les cultures sont plus âgées.

Les sulfites ne sont pas réduits en sulfures. Ces souches ne produisent

pas d'acétyl-méthyl-carbinol. Toutes les souches de *N. asteroides* produisent des amines volatiles. Elles ne produisent pas d'aldéhydes, sauf la souche aberrante. Trois souches dont la souche aberrante, produisent de l'alcool. Aucune ne produit ni indol, ni scatol, ni crésol, ni phénol. Elles ne produisent pas d'SH_2. Huit souches sont uréolytiques, dons 4 faiblement.

POUVOIR PATHOGÈNE

Le pouvoir pathogène de *N. asteroides* a été étudié après injection à 6 souris par voie intrapéritonéale avec 0,5 ml d'une suspension homogène de culture de 10 jours d'étuve. Le pouvoir pathogène des germes varie suivant les souches. Quatre d'entre elles le sont très faiblement ou même pas du tout.

Aucune toxine n'a pu être mise en évidence par injection intraveineuse à la souris de 0,5 ml du surnageant de culture.

Aucune des souches ne produit d'hémolysine sur milieu gélose inclinée au sang.

SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES ET ESSAIS DE CHIMIOTHÉRAPIE

Toutes les souches de *N. asteroides* ont été testées vis-à-vis des principaux antibiotiques par la méthode des disques de Chabbert. Ces épreuves ont été réalisées deux fois pour confirmation: d'abord sur le milieu solide synthétique, puis sur le milieu de Sabouraud.

Ces souches sont très peu sensibles aux antibiotiques: une seule est

Tableau V

Sensibilité aux antibiotiques — Wrażliwość na antybiotyki

Actinomyces Nocardia asteroides Souche nr	Sensibilité aux antibiotiques met. disque													P.A.S.	Met. de dilution dose de:		
	penicyline	strepto-mycine	chloromy-cétine	bacytracine	framycine	tétracycline	aureomy-cine	terramycine	érythromy-cine	spiramycine	carbomy-cine	néomycine			stigptomy-eine	I. N. H. part.	I. N. H. total.
318	—	—	—	−/+	—	−/+	+	—	—	—	−/+	—		—	—	1250	2500
320	—	—	+/−	—	—	−/+	—	+	—	—	−/+	—		—	150	40	2500
322	—	—	—	−/+	—	—	—	—	—	—	−/+	—		—	—	1250	5000
328	—	—	—	−/+	—	—	—	—	—	—	—	—		—	150	1250	2500
331	—	—	−/+	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	1250	5000
333	—	—	−/+	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	50	625	2500
*349**	—	—	—	—	−/+	−/+	−/+	—	—	—	—	—		−/+	1	1250	5000
358	—	—	−/+	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	625	5000
360	—	—	−/+	—	—	−/+	—	—	—	—	—	—		—	1	80	160

Legende: la scuche Sensible +
limite +/−
résistante —

bien inhibée par la terramycine; 5 sont limitées au chloramphénicol, 2 à la bacitracine, 1 à la framycétine, 4 à la tétracycline, 1 à l'aureomycine et 2 à la carbomycine.

Toutes les autres souches sont résistantes vis-à-vis des autres antibiotiques.

Du fait de la proximité des deux genres *Nocardia* et *Mycobacterium* dans la systématique bactérienne, nous avons fait des essais avec les millieux et les antibiotiques utilisés pour le bacille tuberculeux (milieu de Löwenstein-Jensen avec différentes doses d'acide para-amino salycilique, d'isoniazide et de streptomycine). On a constaté que toutes les souches de *Nocardia asteroides* étaient résistantes à la streptomycine, au P. A. S. et à l'I. N. H. aux doses employées pour le bacille tuberculeux.

Nous avons recommencé les expériences avec des doses plus élevées de streptomycine et d'I. N.H. en employant la méthode des dilutions, et constaté que deux souches étaient sensibles à 1 γ/ml de streptomycine, 3 à 50 γ/ml et que 4 souches étaient résistantes à cet antibiotique.

L'I. N. H. a inhibé partiellement la croissance de *N. asteroides* à la dose de 40 γ/ml pour une souche 80 γ/ml pour une autre, 625 γ/ml pour deux souches et 1250 γ/ml pour 5 souches.

La dose totalement inhibitrice est pour une souche de 160 γ/ml, pour 4 souches de 2500 γ/ml et pour 4 souches de 5000 γ/ml. Les doses inhibitrices de l'I. N. H. sur les souches de *N. asteroides* in vitro sont donc très élevées.

Les souris traitées par l'I. N. H. après injection intrapéritonéale de *N. asteroides* n'ont pas été protégées.

CONCLUSIONS

Les souches de *Nocardia asteroides* étudiées sont morphologiquement assez stables: bâtonnets filamenteux, polymorphes, ramifiés, avec renflement, Gram positifs, fréquemment acido-résistants. Les vieilles cultures peuvent donner les difficultés de diagnostic par fragmentation en éléments coccoïdes ou bacilliformes. Présence assez fréquente de spores acido-résistantes.

Cultures de couleurs et de consistance variables dépendent des souches et des milieux de culture. Elles se développent facilement en 3 à 7 jours. Leurs couleurs varient, elles vont du blanc au jaune et au rouge. Elles sont très souvent molles, plissées, quelquefois avec une pulvérulence blanchâtre de mycélium aérien.

Physiologie. Ces souches sont aérobies strictes, catalase positives, faiblement thermorésistantes et d'une grande longévité.

Pouvoir protéolytique. Nul pour toutes les souches.

Utilisation des substances carbonées. L'utilisation

des glucides est en général bonne, sauf celle du galactose; mais le milieu est très lentement et faiblement acidifié, exception faite pour le glycérol qui est utilisé et acidifié à *pH* 3 par toutes les souches après 3 semaines.

L'utilisation des substances carbonées peut permettre dans une certaine mesure de caractériser l'espèce, alors que la modification du *pH* est sans valeur.

Biochimie. En général, les souches ne sont pas biochimiquement très actives. Dans les conditions de nos expériences, on a constaté la présence d'une faible quantité d'acides volatiles, d'acide lactique, d'amines, d'alcool pour quelques souches, et d'ammoniaque en assez grande quantité. Ces souches hydrolysent l'urée et réduisent les nitrates en nitrites.

Pouvoir pathogène. Le pouvoir pathogène est variable pour la souris selon les souches. Ces souches ne produisent ni toxine *in vivo*, ni hémolysine *in vitro*; l'injection à la souris du surnageant de culture ne leur donne aucun symptôme toxique.

Sensibilité aux antibiotiques. Elle est en général très faible. Parmi les 15 antiabiotiques testés, seuls le chloramphénicol, la bacitracine, la tétracycline et la carbomycine semblent avoir une action inhibitrice pour quelques souches, ainsi que la streptomycine et l'I. N. H. à très hautes doses.

Nous tenons à remercier ici M. le Professeur Segretain qui nous a permis de réaliser ce travail dans son laboratoire, ainsi que M. le Docteur Mariat et Mlle J. Satre pour leur aimable aide.

BIBLIOGRAPHIE

Guillaume J., Beerens H., Osteaux R., 1956: La chromatographie sur papier des acides aliphatic volatiles de C_1-C_6. *Ann. Inst. Pasteur* Lille, **8** : 15.

Lebert F. et Tardieux P., 1952: Technique d'isolement et de détermination des bactéries anaérobies. *Coll. Trav. Pathol. Comp.* ed 2.

Mackinnon J. E., Artagaveytia-Allende R. G., 1956: The main species of pathogenic actinomycetes causing mycetomas. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **50** : 31.

Mariat F., 1954: Physiologie des actinomycètes aérobies. *Ann. Inst. Pasteur.*, **86** : 479.

Mariat F., 1957: Les principaux actinomycès aérobies responsables de mycétomes. *Sex. Hop. Paris. P. B.*, **33** : 939.

Mariat F., 1958: Physiologie des actinomycètes aérobies pathogènes. *Mycpathol.* et *Mycol. Applic.*, **2** : 111.

Waksman S. A. 1918: Studies in the metabolisme of pathogenic actinomycetes. *J. inf. Dis.*, **23** : 547.

Waksman S. A., 1919: Studies in the metabolisme of *Actinomycetes*. *J. Bact.*, **4** : 189, 307.

Waksman S. A., 1957: Species conceipt among the *Actinomycetes* with special reference to the genus *Streptomyces.*, *Bact. Rev.*, **21** : 1.

M. Bedryńska-Dobek

WŁAŚCIWOŚCI MORFOLOGICZNE, HODOWLANE, BIOCHEMICZNE I CHOROBOTWÓRCZE ORAZ ODPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI 9 SZCZEPÓW *NOCARDIA ASTEROIDES*

Streszczenie

Zbadano 9 szczepów *N. asteroides*, określając ich cechy morfologiczne (tab. I), typ wzrostu na pożywkach laboratoryjnych (tab. II), zdolność do proteolizy i wykorzystywania różnych organicznych związków węgla (tab. IIII), ilość i jakość produktów dysymilacji węglowodanów, aminokwasów, zdolność do redukcji azotanów i rozkładu mocznika (tab. IV).

Ponadto przebadano właściwości chorobotwórcze *N. asteroides* w stosunku do białych myszek i zdolność wytwarzania toksyn i hemolizyny. Określono też wrażliwość szczepów na antybiotyki i środki chemoterapeutyczne (tab. V).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 355—357

K. Dygdała

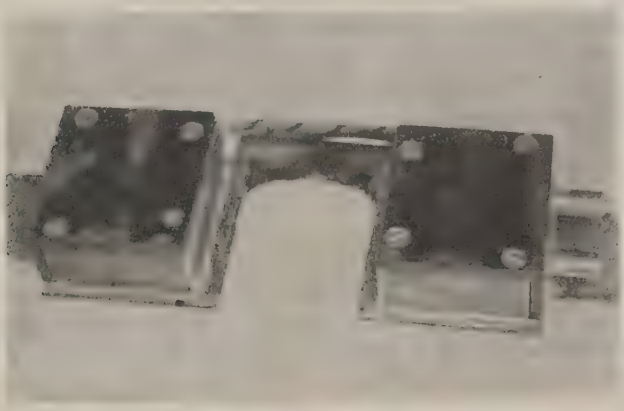
A NEW MODEL OF HEATING MICROSCOPIC STAGE

From the Department of General Microbiology, M. C. Skłodowska University. Lublin
Received 10. III. 1960

A heating stage provides possibilities for constant observations of the development of living organisms in their microculture. An optimal temperature for the growth of different kinds of microorganisms can be maintained in these conditions.

The heating stage may be also useful for some chemical investigations, e. g. in case of the crystallization of different compounds and in other cases.

Leitz, Reichert and Wild already manufacture differen types of this arrangement. The model made by Leitz can be applied as well for studies at high and low temperatures, but its use seems to be rather complicated.



Phot. 1. General view of heating microscopic stage
Fot. 1. Ogólny widok stolika ogrzewczego

The model of Reichert and a similar one described by Herčik * (in 1953) do not seem to be appropriate for microscopic observations at high magnification, because the thickness of the stage itself, as well as of the microscopic slides and of the layer of nutrient agar, esp. in case of phase-contrast microscope cause a big loss of light.

The model constructed by the author is very simple and can be used in case of all magnifications of simple and contrast-phase microscopes.

DESCRIPTION OF THE NEW MODEL

In order to make the heating stage we use a copper plate 106 mm long, 32 mm wide and 1 mm thick. The long edges are bend up so as to obtain a side border 1 mm high. Now we get a channel 30 mm wide, with the microscopic slide to the microscope slide to the microscope stage out the parts marked on fig. 1.

On the squares *A* and *B* we place the heating elements connected with the resisting apparatus.

The electric current flowing through the elements heats up the copper plate, which warms up the tightly fitting microscopic slide.

Sticking out ends of the copper plate enables us to fix it together with the microscopic slide to the microscope stage by using common spring catches.

HEATING ELEMENTS

From a brass plate 80×15×0.5 mm we make four sides of a square box, as shown on fig. 3. In the points "*b*" we make holes for screws fixing the lid. In the points "*d*" we make holes, which will serve to fix the contact and on the other side to push through the electric wires. Then we solder the boxes to the plates *A* and *B* along the edges "*c*". We put mica slices into the boxes. On the slices 18×18 mm we wind up in spiral courses the wire 0.3 mm in diameter and 45 mm long with the resistance 4 Ohms. The wire should be isolated from the bottom and side metal plates with mica slices.

The wire is wrapped around the mica slice in the box *A*, then through the hole "*d*" the wire goes to the box *B*, where after winding around the mica slice (there ought to be the same number of coils in each box) the wire goes back to the box *A*. There both ends are to be fixed to the contact plate. This plate is fixed on a backelite plate 24×9 mm screwed to the brass box. The lid is made of backelite, 24×24 mm, and fastened to the box with 4 screws.

---

* Herčik F., Barłonek M., 1953: Sogriewatielnyj stolik dla mikroskopa. *Čech. Biol.*, 2: 246.

The temperature of the heated slides was checked by the use of chemical compounds of a known melting point (phenol + 41°C, N-benzyl-aniline + 36°C). We put a crystal of one of these subtances on the slide covering the examined object.

The author has already used with success his heating stage for constant observations of the development of some kinds of bacteria. The results will be given in another paper.

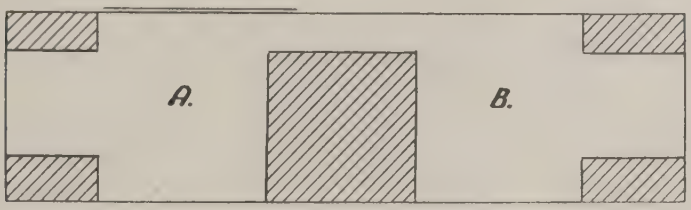


Fig. 1. See description in the text. Natural size
Opis w tekście. Wielkość naturalna

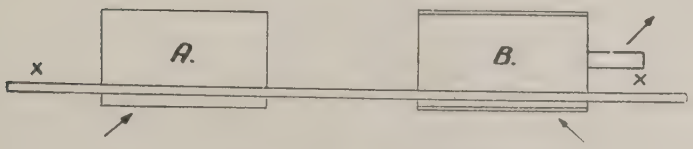


Fig. 2. The front of the microscopic stage
Widok stolika z przodu
A, B — The heating elements — Elementy grzejne. Arrows showing the long edge of the copper plate, that are bend. (Strzałki pokazują zagięty brzeg blachy miedzianej)

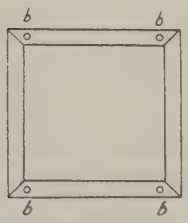


Fig. 3. View of the top of the square box
Widok komory grzejnej z góry

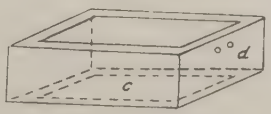


Fig. 4. Its-side view.
Widok komory grzejnej z boku

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 359—366

I. Januszewicz

WPŁYW PODŁOŻA NA AKTYWNOŚĆ *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES*

Z Pracowni Mikrobiologii Technicznej Instytutu Przemysłu Farmaceutycznego
w Warszawie
Wpłynęło dnia 2 lipca 1959 r.

W pracy nad biosyntezą dekstranu w skali laboratoryjnej i półtechnicznej prowadzonej w naszym zakładzie od 1952 r. największą trudność sprawiało utrzymywanie kultury w stanie aktywnym, ponieważ *Leuconostoc mesenteroides* przeszczepiany na podłoże sztuczne w warunkach laboratoryjnych zatracał zdolności do intensywnego tworzenia dekstranu.

Ewens i Hibbert (1946) również obserwowali, że tworzenie się dekstranu z sacharozy może mieć charakter przejściowy. Szczególnie przy częstych przeszczepieniach w warunkach laboratoryjnych, zdolność do wytwarzania polisacharydów może nagle zniknąć. Pederson i Albury (1955) przeprowadzili badania ze 150 kulturami, wyosobnionymi z kiszonek roślinnych. Kultury posiadały wszystkie cechy charakterystyczne dla gatunku *Leuconostoc mesenteroides*, z wyjątkiem tworzenia wyraźnych ilości dekstranu na podłożu z sacharozą. Stosując jednak wielokrotne przeszczepienia na odpowiednie podłoże (z dodatkiem soku pomarańczowego, pomidorowego lub soku z winogron), prawie we wszystkich wypadkach udało się uzyskać szczepy zdolne do wytwarzania dekstranu. Kultury typowe natomiast, tworzące dekstran, po kilku przeszczepieniach na podłoże o wzrastającym stężeniu chlorku sodu (2,5-6,5%) traciły zdolność do tworzenia dekstranu. Zdolność do syntezy dekstranu jest więc cechą zmienną, którą bakterie mogą utracić względnie nabyć w określonych warunkach hodowli.

Jak wykazano poprzednio (Januszewicz 1955, 1957), kultury przechowywane w stanie zliofilizowanym, po reaktywacji odznaczały się dużą aktywnością dekstranotwórczą.

W hodowli laboratoryjnej osłabienie zdolności dekstranotwórczej kultury następuje często nagle, ożywienie zaś kultury zliofilizowanej i sprawdzenie jej aktywności wymaga przynajmniej 10 dni. Istnieje zatem obawa,

że w wytwórni może nastąpić obniżenie wydajności produkcji dekstranu, narażające fabrykę na duże straty.

Z tych względów w grudniu 1955 r. rozpoczęliśmy doświadczenia, zmierzające do utrzymania aktywności kultury na pewnym ustalonym poziomie oraz do regeneracji kultur zdegenerowanych.

METODA BADAŃ

Pierwsza seria doświadczeń została przeprowadzona na podłożu zwykle stosowanym (podstawowe podłoże A) lecz wzbogacanym dodatkiem autolizatu względnie soku brzozowego. *pH* podłoża nastawiano na 6,7 przed wyjałowieniem. Wyjałowiano w parze bieżącej w ciągu 3 kolejnych dni.

Podstawowe podłoże A:

KH_2PO_4	— 1,0 g
$NaNH_4HPO_4$	— 0,3 g
KCl	— 0,1 g
$MgSO_4$	— 0,1 g
$MnCL_2$	— 0,01 g
$(NH_4)6Mo_7\ 0_{24}$	— 0,005 g
sacharoza	— 100 g

autolizat drożdżowy (jałowiony przez sączenie) — 10 ml
woda wodociągowa warszawska — do 1000 ml.

Podłoże B: do 10 ml zagrzanego do 60° podłoża A dodano następujące ilości autolizatu drożdżowego (jałowionego przez sączenie): 0,075, 0,112, 0,149, 0,177 i 0,214 ml i po zamieszaniu natychmiast chłodzono.

Podłoże agarowe C: o składzie jak podłoże A, lecz nie zawierające autolizatu. Zamiast wody użyto tu soku brzozowego, zebranego na wiosnę.

Drugą serię doświadczeń przeprowadzono na podłożu podstawowym A, przygotowanym na różnych rodzajach wody studziennej pochodzącej z okolic Warszawy: z Okęcia, Włoch i Gołkowa.

W trzeciej serii doświadczeń stosowano: a) podłoże A z buforem octanowym; *pH* 7,0, b) podłoże A z dodatkiem 1% $CaCO_3$; *pH* 7,1, c) podłoże A z dodatkiem 1% $CaCO_3$ i 0,1% węgla aktywnego; *pH* 7,1.

Biosyntezę dekstranu na podłożu płynnym prowadzono wg techniki opisanej uprzednio (Januszewicz 1957).

OZNACZENIE DEKSTRANU

Stężenie dekstranu w czasie fermentacji oznaczano metodą antronową (Scott i Melvin 1953) po uprzednim oczyszczeniu brzeczki z cukrów przez dializę. Pomiary ekstynkcji wykonywano na fotokolorymetrze typ KF-2 (Warszawskie Zakłady Aparatury Kontrolnej i Pomiarowej), przy filtrze czerwonym.

Analizy fizyko-chemiczne naturalnego dekstranu wykonano wg techniki podanej przez Januszewicz (1955).

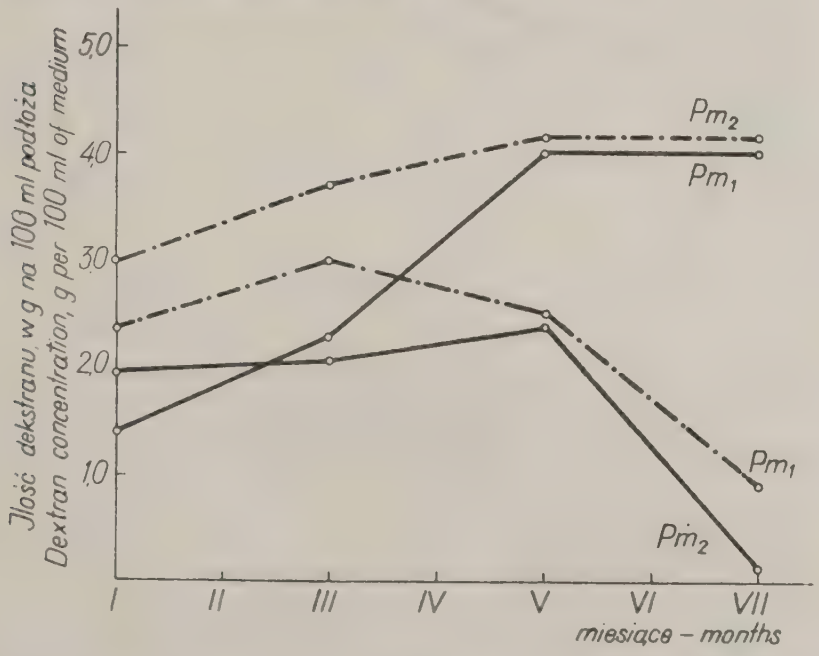
WYNIKI

Do pierwszej serii doświadczeń wybrano 2 zdegenerowane i 3 aktywne kultury szczepu *L. mesenteroides L* (Januszewicz 1953) oraz 3 zdegenerowane i 2 aktywne hodowle szczepu *L. mesenteroides Pm* (Januszewicz 1956). Kultury przesiewano co 7 dni na podłoże B.

Mniej więcej co 3 miesiące wykonywano probę fermentacyjną na podłożu płynnym. Dekstran w podłożu fermentacyjnym oznaczano po 3 i 6 dniach w dwu równoległych kolbach.

Hodowla na podłożu A służyła jako kontrola do określania wpływu zmodyfikowanego podłoża na biosyntezę dekstranu.

Stwierdzono, że istnieje wyraźny wpływ podłoża na zachowanie zdolności dekstranotwórczej. Podłoże nie wpływa jednakowo na wszystkie kultury. Podłoże B wywarło wpływ dodatni na 6 kultur, 2 kultury nie zareagowały (1 aktywna i 1 zdegenerowana) na podłoże B, u 2 kultur wykazano wyraźny spadek zdolności do syntezy dekstranu.

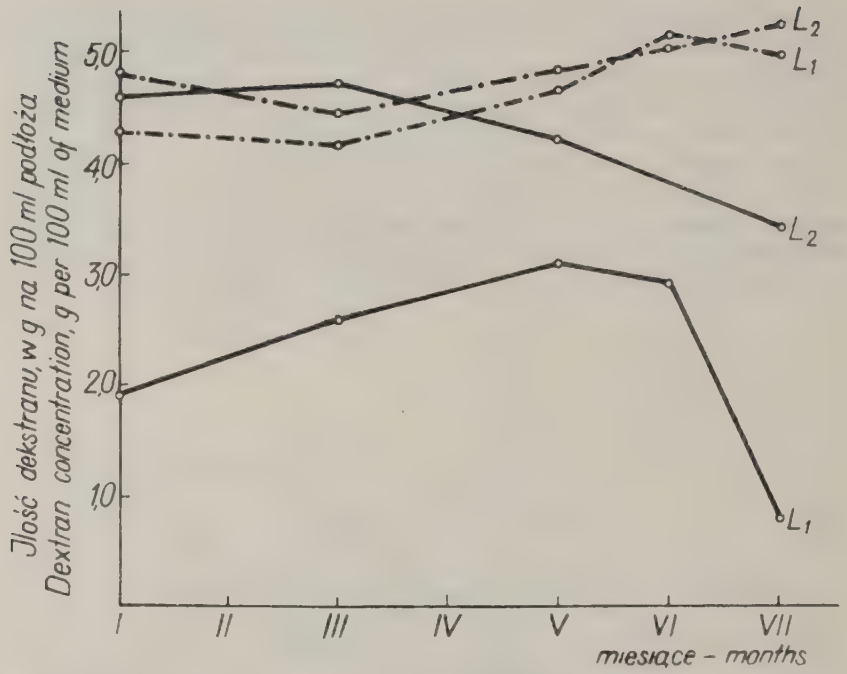


Rys. 1. Wpływ hodowli na podłożu A i B na wydajność dekstranu kultury Pm_1 i Pm_2; ———— podłoże A (kontrola), —·—·—·— podłoże B.

Fig. 1. Effect of prolonged cultivation of strains Pm_1 and Pm_2 in the media A and B on the yield of dextran; ———— medium A (control), —·—·—·— medium B.

Rys. 1 przedstawia wpływ hodowli bakterii na podłożu B na wytwarzanie dekstranu przez 2 kultury *Pm*, zaś rys. 2 przez 2 kultury *L*.

Niejednakowa reakcja kultur na dodatek autolizatu nasunęła przypuszczenie, że dla każdej kultury istnieje odmienna optymalna dawka



Rys. 2. Wpływ hodowli na podłożu A i B na wydajność dekstranu kultur L_1 i L_2; ———— podłoże A (kontrola), —·—·—·—·— podłoże B.

Fig. 2. Effect of prolonged cultivation of strains L_1 and L_2 in the media A and B on the yield of dextran; ———— medium A (control), —·—·—·—·— medium B.

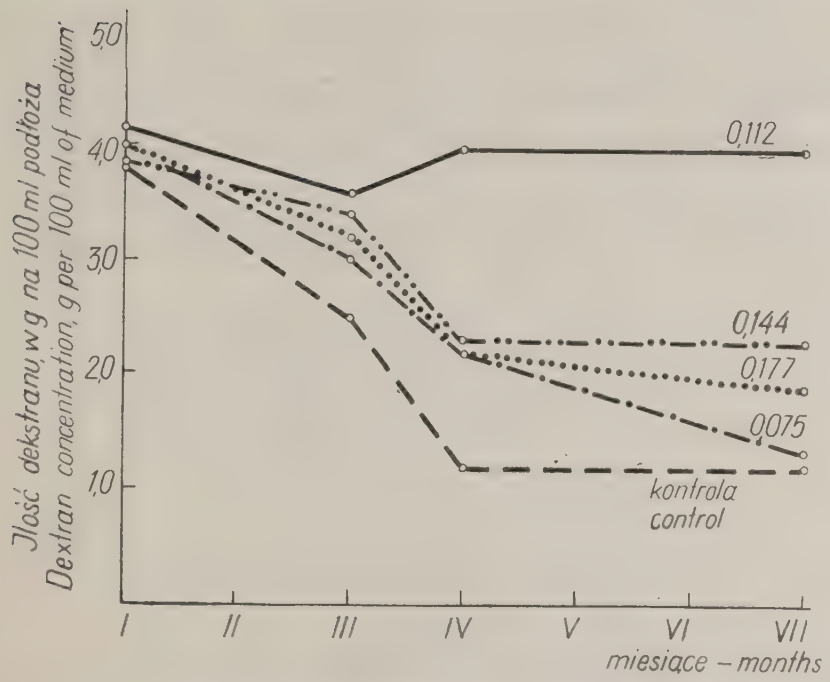
autolizatu w podłożu. Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły to przypuszczenie.

Rys. 3 przedstawia wpływ różnych dawek autolizatu do podłoża agarowego na zdolność syntezy dekstranu przez szczep Pm_3.

Na rysunku pominięto dawkę autolizatu 0,214 ml na 10 ml podłoża, która nie wywarła widocznego wpływu. Optymalna dawka autolizatu dla tej kultury wynosiła 0,112 ml na 10 ml podłoża podstawowego.

Dla innej kultury optymalna dawka autolizatu w podłożu wynosiła 0,149 ml na 10 ml podłoża.

Równolegle prowadzono hodowlę na podłożu agarowym C (sok brzozowy zamiast wody) przesiewając co 7 dni 5 wybranych kultur. Wzrost na tym podłożu był bardzo słaby; 2 kultury po 4 szczepieniach nie rozwijały się zupełnie. Próba aktywności z pozostałymi trzema kulturami wykonana na podłożu płynnym wykazała, że tworzą one dekstran w ilo-



Rys. 3. Wpływ autolizatu na wydajność dekstranu (kultura Pm_3). Cyfry oznaczają ilość ml autolizatu na 10 ml podłoża A.

Fig. 3. Influence of yeast autolysate on yield of dextran (strain Pm_3). Figures denote the amount of autolysate in ml, added per 10 ml of the medium A.

ściach śladowych. Pozytywnych rezultatów nie uzyskano przy użyciu soku brzozowego wyjałowianego przez sączenie a nie podwyższoną temperaturę.

W drugiej serii doświadczeń hodowlę 3 kultur (2 aktywnych i 1 zdegenerowanej) prowadzono na podłożu podstawowym, sporządzanym na wodach studziennych różnego pochodzenia, z okolic Warszawy: z Okęcia, Włoch i Gołkowa. Bakterie posiewano co 7 dni przez 3 miesiące. Analiz chemicznych wody nie wykonano. Zwykła analiza chemiczna wody, jak stwierdzono w pracy poprzedniej (J a n u s z e w i c z 1955), nie dała na to odpowiedzi.

Pochodzenie wody używanej do przygotowania podłoża ma bardzo duży wpływ na zachowanie aktywności bakterii i biosyntezę dekstranu.

Reakcja poszczególnych kultur na wodę jest bardzo specyficzna. Słabo reagował szczep Pm_2, szczególnie zaś wrażliwy okazał się szczep Pm_1. Po

Wyniki doświadczeń przedstawia tabela I.

Tabela I

Zależność wydajności dekstranu od rodzaju wody studziennej użytej do przygotowania podłoża

Influence of the kind of water used for production culture-media on the yield of dextran

Kultura Strain	Rodzaj wody Kind of water	Czas hodowli (miesiące) Duration of culture (months)			
		1,5		3	
		procent dekstranu w podłożu Dextran concentration, p. cj			
		czas fermentacji (dni) Fermentation (days)			
		3	6	3	6
L_1	kontrola, wodociągowa woda warszawska	1,1	1,6	1,1	2,1
	Okęcie	1,9	2,2	2,1	3,2
	Włochy	1,4	1,5	1,7	2,5
	Gołków	1,7	1,5	2,1	3,1
Pm_1	kontrola	2,7	3,3	3,4	4,2
	Okęcie	4,3	4,8	4,4	4,8
	Włochy	1,5	1,5	ślady	ślady
	Gołków	4,6	4,6	4,8	4,8
Pm_2	kontrola	4,6	4,7	4,7	4,8
	Okęcie	4,3	4,6	4,2	4,9
	Włochy	4,2	4,4	3,8	4,6
	Gołków	4,6	4,6	4,8	4,8

3 miesiącach hodowli na podłożu przygotowanym na wodzie z Włoch, zdolność do syntezy dekstranu zanikła niemal zupełnie. Podłoża przygotowane na wodzie z Gołkowa i Okęcia wpłynęły natomiast korzystnie na syntezę dekstranu przez ten szczep.

Również mało aktywna kultura *L*, hodowana na podłożu przygotowanym na wodzie z Okęcia i Gołkowa wykazała większą zdolność do syntezy dekstranu niż w kontroli.

W trzeciej serii doświadczeń zbuforowano podłoże w celu niedopuszczenia do nadmiernego zakwaszania (normalnie po 5 dniach hodowli *pH* spada z 7,0 do 3,5). W tym samym celu dodawano do podłoża $CaCO_3$. Celem dodatku węgla aktywnego była ewentualna adsorpcja szkodliwych

produktów przemiany materii, gromadzących się w czasie hodowli. Do doświadczenia użyto 2 kultury aktywne i 2 zdegenerowane szczepu *L.* Hodowla trwała 18 miesięcy (bakterie przesiewano co 7 dni). Co pewien czas sprawdzano zdolność kultur do syntezy dekstranu. Jako kontrola służyła hodowla na podłożu podstawowym A.

Wszystkie kultury hodowane na podłożu zbuforowanym zatraciły zdolność do biosyntezy dekstranu.

Po 18 miesiącach hodowli na podłożach z dodatkiem $CaCO_3$ i węgla uzyskano następujące wyniki, podane w tabeli II.

Tabela II

Wpływ $CaCO_3$ i węgla aktywnego na aktywność syntezy dekstranu (wydajność dekstranu w % wprowadzonej sacharozy po 3 dniach fermentacji)
Influence of $CaCO_3$ and activated carbon added to the culture-medium on the yield of dextran; in p. c. of saccharose utilized after 3-days fermentation

Podłoże Medium	Kultura — strain							
	I		II		I		II	
	L zdegenerowany		*L* zdegenerowany		*L* aktywny		*L* aktywny	
	Czas hodowli w miesiącach Duration of culture in months							
	0	18	0	18	0	18	0	18
Podstawowe A	9,5	ślady	17,0	6,4	39,0	11,0	42,0	16,0
Podstawowe A + 1% $CaCO_3$		16,4		19,0		21,2		20,2
Podstawowe A + 1% $CaCO_3$ + 0,1% węgla aktywnego		14,4		16,6		35,0		32,4

Wszystkie kultury hodowane na podłożu kontrolnym A wykazały znaczny spadek wydajności. Wydajność 2 kultur aktywnych obniżyła się o około 60%.

Najlepsze rezultaty uzyskano na podłożu z dodatkiem węglanu wapnia i węgla aktywnego, jednak i w tym przypadku nastąpił spadek wydajności dekstranu kultur aktywnych.

Surowy dekstran otrzymany w tych doświadczeniach odpowiadał pod względem fizyko-chemicznym normom ustalonym wspólnie przez Instytut Przemysłu Fermentacyjnego i Instytut Farmaceutyczny (Janusz e w i c z 1955).

LITERATURA

Ewans T. H., Hibbert H., 1946: Bacterial polisaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem.*, New York, **2**: 203.

Januszewicz I., 1953: Wyosobnienie odpowiedniego szczepu *Leuconostoc mesenteroides* i opracowanie laboratoryjne warunków biosyntezy dekstranu. Główny Instytut Przemysłu Rolnego i Spożywczego (praca nieopublikowana).

Januszewicz I., 1955: Zmiany własności biochemicznych szczepu *Leuconostoc mesenteroides* w zależności od różnych warunków przechowywania. *Acta Microbiol. Polon.* **4**: 205.

Januszewicz I., 1956: Biosynteza dekstranu przez różne szczepy *Leuconostoc mesenteroides*. *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 217.

Januszewicz I., 1957: Zmiany własności biochemicznych szczepu *Leuconostoc mesenteroides* w zależności od warunków przechowywania. *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 357.

Pederson C. S., Albury M. N., 1955: Variation among the heterofermentative lactic acid bacteria. *J. Bact.*, **70**: 702.

Scott T. A., Melvin E. H., 1953: Determination of dextran with anthrone. *Anal. Chem.*, **25**: 1956.

L. Januszewicz

INFLUENCE OF CULTURE-MEDIUM ON DEXTRAN—PRODUCTIVITY OF *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES*

Summary

It was shown that the yield of dextran in cultures of different strains of *L. mesenteroides* was markedly influenced by the composition of the medium. At the same time, the influence of a given medium constituent may be different, depending on the characters of strain examined.

It was also possible, by using suitable media, to fix the dextran producing capacity of *L. mesenteroides* on a permanent level. The same media were suitable for regeneration of cultures, which partially lost their capability for dextran production (see fig. 1 a. 2).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1960, 9 : 367—373

W. Myśków

THE DISSOLVING OF CALCIUM PHOSPHATE BY SOME SOIL BACTERIA

From the Department of Soil Microbiology
Puławy

Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa
Puławy
Received 2. VII. 1959

Mineral phosprorus occurs in the soil in compounds available and unavailable for plants. The compounds that are difficult to dissolve can be rendered movable by the action of plants and microorganisms. Kunze (1906), Kröber (1909), Perotti (1909), Stoklasa (1911), Sewerin (1910, 1912), Sauerlandt (1933), Feher (1935), Sing Chen Chang (1939), Balls and Sarkadi (1952), Kreybig (1953) showed the share of microorganisms in this process.

It has been supposed that the dissolving of calcium phosphates is due to organic acids produced by microorganisms (Kröber 1909, Perotti 1911, Stoklasa 1911), by carbonic acid (Kröber 1909, Stoklasa 1911, Bassalik 1912, 1913) and by other inorganic acids produced by autotrophic microorganisms (Lipman, Mc Lean and Lint 1916, Waksman 1927, Kreybig 1930). Acids produced by the microorganisms dissolve not only calcium phosphates in the soil but also silicate (Bassalik 1912). Sacket, Patten and Brown (1908) and Stoklasa (1909) show the special ability of proteolytic bacteria to dissolve calcium phosphates. According to Grazia (1911) and Kreybig (1953) unavailable calcium phosphates may be dissolved by enzymes of microorganisms. It is now generally accepted that the process of dissolving phosphorus in mineral campounds may also be caused by exchange reactions between the different microbial metabolites and the unavailable phosphates [Struthers and Sieling 1950, Dalton 1952, Bradley and Sieling 1953, Sierdobolski (according to Muromcewa 1957)].

Pikowska (1948) isolated short rods and cocci of variable forms

dissolving easily calcium phosphates. Uarowa (1956) isolated *Micrococcus radiatus, Chromobacter aurantiacum, Pseudomonas radiobacter* able to dissolve calcium phosphates. Leszlo and Popp (1957) found the same ability in bacterium related to *Bacillus megatherium.*

EXPERIMENTAL RESULTS

MATERIAL AND METHODS

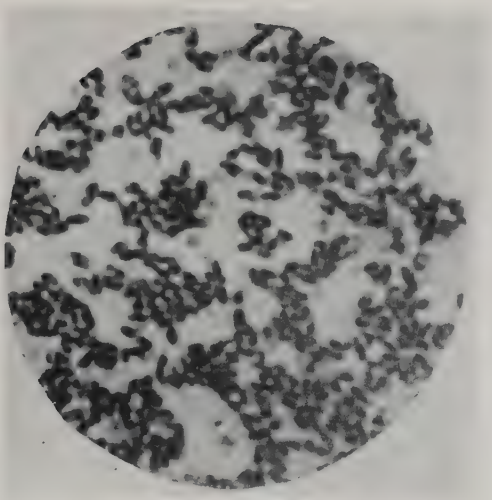
It was the author's purpose to examine the morphology and physiology of microorganisms able to dissolve calcium phosphates. At the same time the author tried to find the formula for the cultural medium most suitable for the study of this bacterial property. 23 strains of bacteria and 10 strains of fungi (2 strains of *Rhodotorula* and 8 of *Penicillium*) were isolated from soil and plant rhizosphere in synthetic medium with glucose and tricalcium phosphate as the sole source of phosphorus. Among the isolated bacteria were 16 strains of aerobic non-sporeforming rods and 16 strains resembling diphteroids. The rods (phot. 1, 2) formed greyish-white, turning later brown colonies on agar plates with glucose and tricalcium phosphate. In cultures of strain no *13* we noted after a few days the fragmentation of elongated forms in short rod-shaped bacteria (phot. 3, 4).

The activity of isolated strains was examined on the following medium: $(NH_4)_2SO_4$ — 0.5 g, $Ca_3(PO_4)_2$ — 5.0 g, glucose — 20 g, NaCl — 0.2 g, $MgSO_4$ — 0.1 g, $MnSO_4$ — traces, $FeSO_4$ — traces, agar — 20 g, yeast-extract — 12.5 ml, soil extract — 12.5 g, water — 975 ml, *pH* about 7. After 4-5 days of incubation the width of the clear zones of dissolved phosphates around colonies was measured. It varied from 1 to 10 mm.

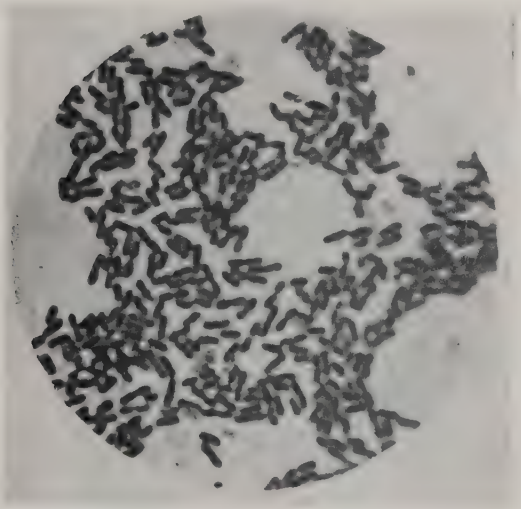
The amount of dissolved calcium phosphates was also determined by the colorimetric method in liquid cultures (after 10 days of incubation at 28-30°C). For this aim the Erlenmayer flasks containing 20 ml of a liquid synthetic medium were used.

The majority of examined strains dissolved great amounts of tricalcium phosphate (Table I). In general, the amount of phospate released was related to the production of acids by isolated microorganisms. *Penicillia* yet, that formed more acids than bacteria, dissolved less phosphate (50-70 p. c. of the total P_2O_5). This was, at least to some extent, due to the reassimilation of a great quantities of phosphorus by the abundantly growing *Penicillia.*

Two bacterial strains have been chosen for further studies of the optimal conditions for releasing phosphorus from calcium phosphates: strain no *13* (*Pseudomonas sp.*), moderately dissolving calcium phosphates and strain no *14*, resembling *Achromobacter*, which was very active in that respect.

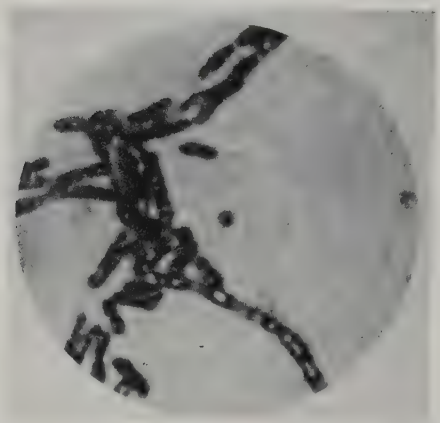


Fot. 1 — Szczep bakterii nr 13. Powiększenie 3400 ×
Phot. 1 — Strain no 13. 3400×



Fot. 2 — Szczep bakterii nr 14. Powiększenie 3400 ×
Phot. 2 — Strain no 14. 3400 ×

Fot. 3 — Szczep bakterii nr 3. Powiększenie 3400 ×
Phot. 3 — Strain no 3. 3400 ×



Fot. 4 — Szczep bakterii nr 7. Powiększenie 3400 ×
Phot. 4 — Strain no 7. 3400 ×

Table I

Amount of phosphorus released from $Ca_3(PO_4)_2$, after 10 incubation days
Ilości fosforu uruchomionego z $Ca_3(PO_4)_2$ pod wpływem badanych szczepów w płynnej pożywce po 10 dniach hodowli

Kind of microorganisms	Quantity of strains studied	Amount of released phosphorus, mg P_2O_5 per 1 flask	*pH* of culture medium
Rhodotorula	2	< 12	2.0—5.4
Penicillium	5	12—16	2.0—4.0
Rods and organisms similar to diphteroids	20	16—20	3.0—4.4

THE INFLUENCE OF DIFFERENT CARBON SOURCE

The semi-synthetic agar medium (see p. —0) was used. Followings carbon compounds (each in quantity of 2 p. c.) were added: clucose, fructose, mannose, galactose, saccharose, maltose, lactose, mannitol, ethyl alcohol, glycerol, natrium or calcium citrate and natrium acetate. The results are shown in Table II.

Table II

Effect of the carbon source on the growth of strains nos 13 and 14 and on dissolving of tricalcium phosphate
Wzrost szczepów nr 13 i 14 i ich zdolność do rozpuszczania fosforanów wapnia w zależności od różnych związków węgla

Source of carbon	Strain no 13			Strain no 14		
	growth	dissolving $Ca_3(PO_4)_2$	*pH* of medium	growth	dissolving $Ca_3(PO_4)_2$	*pH* of medium
Glucose	×××	++	4,2	×××	++++	< 3,8
Fructose	××××	0	6,5	××××	0-+	4,2
Mannose	×××	++	3,8	×××	++	3,8
Galactose	×××	++	4,0	×××	++++	3,8
Saccharose	×××	+	4,0	××××	++	3,9
Maltose	×	0	6,7	×	+++	3,8
Lactose	××	0	6,6	×	+++	4,0
Mannitol	××××	0-+	5,0	×××	+	4,2
Ethyl alcohol	0-×	0	7,1	0-×	0	7,0
Glycerol	××	0	6,9	××	+	6,1
Natrium citrate	×	0	7,3	×	0	7,3
Calcium citrate	××	+	7,3	××	++	7.3
Natrium acetate	0-×	0	7,3	××	0	7,6

pH of culture media at the beginning of experiment: ± 7

0 no dissolving
0—+ very slight dissolving
\+ slight dissolving
++ moderate dissolving
+++ strong dissolving
++++ very strong dissolving

0 no growth
0—× very slight growth
× slight growth
×× moderate growth
××× strong growth
×××× very strong growth

The intensity of dissolving calcium phosphates was the highest on sugar media. On disanscharides (maltose and lactose) strain no 13, contrary to strain no 14, did not dissolve calcium phosphates. Both strains did not dissolve phosphates when cultivated on fructose.

No calcium phosphate was dissolved when neutral salts of organic acids were the sole source of carbon. Some dissolution was noted only in the presence of calcium citrate in spite of slightly alcaline reaction of the medium.

THE INFLUENCE OF VARIOUS NITROGEN COMPOUNDS

The effects of following nitrogen compounds have been studied (added in the quantity of 0,1 p. c. to semi-synthetic agar medium containing 2 p. c. of glucose): $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, urea, peptone, asparagine, d.l-tyrosine, valine, glycine, d.l-serine and arginine. Nutrient agar with 1 p.c. of glucose and 0.5 p. c. of tricalcium phosphate was also used. The results are shown in Table III.

Table III

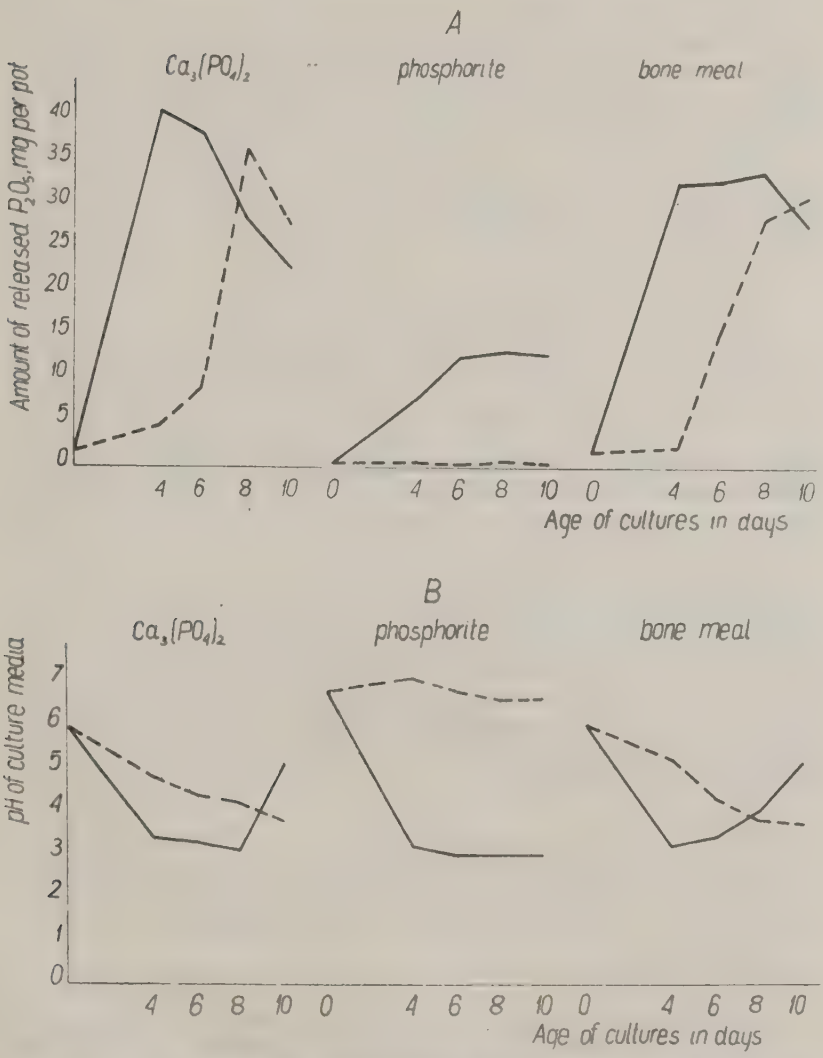
Effect of nitrogen source on the growth of strains nos 13 and 14 and on dissolving of tricalcium phosphate
Wzrost szczepów nr 13 i 14 i ich zdolność do rozpuszczania fosforanów wapnia w zależności od różnych związków azotu

Source of nitrogen	Strain no 13			Strain no 14		
	growth	dissolving $Ca_3(PO_4)_2$	*pH* of medium	growth	dissolving $Ca_3(PO_4)_2$	*pH* of medium
$(NH_4)_2SO_4$	×××	++	4,3	×××	+++	4,2
$NaNO_3$	××××	0	not determined	××××	++	not determined
Agar broth + 1% of glucose	×	0	unchangend	×××	0	6,5-7,3
Urea	×××	0	6,1-6,7	×××	++	4,4
Peptone	××××	++	4,0	×××	++++	3,8
Asparagine	××××	0-+	4,2-5,0	××××	+++	4,2
D, l-tyrosine	×××	++	4,3	×××	+++	4,3
Valine	××-×××	++	4,4	××	+++	5,4-6,1
Glycine	×-××	0	5,5-6,0	×××	+	5,4-6,1
D, l-cysteine	××	+-++	4,6-4,8	×-××	+++	6,1
D, l-serine	×-××	+	4.4-4,6	××	++-+++	4,2-4,8
Arginine	×××	0-+	4,6-4,8	××××	+	5,4-6,1

pH of culture media at the beginning of experiment 6.6-6.9

0 no growth
0—× very slight growth
× slight growth
×× moderate growth
××× strong growth
×××× very strong growth

0 no dissolving
0—+ very slight dissolving
+ slight dissolving
++ moderate dissolving
+++ strong dissolving
++++ very strong dissolving



Rys. 1a i 1b — Wpływ czasu trwania hodowli szczepów nr 13 i 14: a — na rozpuszczanie trudno przyswajalnych fosforanów wapnia, b — na stopień zakwaszenia pożywki: — — — szczep nr 13, —·— ·— szczep nr 14

Fig. 1a and 1b — The effect of incubation period of strains nos 13 and 14: a — upon the dissolving of insoluble calcium phosphates, b — upon the acidifying of medium: — — — strain no 13, ———— strain no 14

The kind of the nitrogen source had a marked influence on both strains examined. They both grew better on nitrate than on ammonium sulphate and on peptone, asparagine and arginine than on cysteine or serine. On agar broth the strain no *14* grew batter than no *13*.

The favourable effect of peptone, tyrosine and valine on the rate of solubilisation of tricalcium phosphate was observed. This process was inhibited on the media containing nitrate, urea, glycine or arginine.

This effect was more marked in strain no *13*. On agar broth with glucose, tricalcium phosphate was not dissolved by both strains.

THE SOLUBILISATION OF PHOSPHORUS FROM PHOSPHORITE AND BONE MEAL IN LIQUID CULTURES

A liquid medium with glucose and phosphorite or bone meal instead of pure tricalcium phosphate was applied in this experiment. Medium containing tricalcium phosphate served as control. The experiment was carried out in Erlenmeyer flasks containing 30 ml of medium and 150 mg either of tricalcium phosphate, of bone meal or of phosphorite. The cultures were kept for 4-10 days at 28-30°C. The ammount of phosphate released and the *pH* of medium were determined after 4, 6, 8 and 10 days. The results are shown on Fig. 1 and 2.

Both the strains dissolved as well tricalcium phosphate as phosphate contained in bone meal or in phosphorites. Strain no *14* was more active than strain no *13*. A rise of acidity of the medium was paralleled by the increase of the amount of released phosphorus (Fig. 2). There was yet no strict correlation between these both indices. After prolonged incubation the amount of soluble phosphate in the medium decreased. This was probably caused by precipation of soluble phosphate and or by its assimilation by the organisms.

LITERATURE

Balla H., Sarkadi J., 1952 : Badania laboratoryjne nad obornikiem kompostowym z dodatkiem fosforytu i apatytu. *Agrokom. taljtan,* **4** : 471.

Bassalik K., 1912 : Über Silikatzersetzung durch Bodenbakterien. *Ztschr. Gärungsphysiol.,* **2** : 1.

Bassalik K., 1913 : Über Silikatzersetzung durch Bodenbakterien. *Ztschr. Gärungsphysiol.,* **3** : 14.

Bradley D. B., Sieling D. H., 1953 : Effect of organic anions and sugars on phosphate precipitation by iron and aluminium as influenced by pH, *Soil Sci.,* **76** : 175.

Dalton J. D., Russell G. C., Sieling D. H., 1952: Effect of organic matter on phosphate availability. *Soil Sci.,* **73** : 173.

Feher D., 1935 : Beiträge zum Problem des mikrobiologischem Kreislaufes des Phosphors im Boden. *Phosphorsäure,* **5** : 706.

Grazia de S., 1910: Sul intervento dei microorganismi nell utilisatione dei fosfati insolubili del suolo da parte delle piante superiori. *Stationi sperim. agrarial.,* **43** : 179.

Kreybig L., 1930 : Die Bedingungen der Wirtschaftlichkeit der Handelsdünger.
Kreybig L., 1953 : Die biologische Aufschliessung und praktische Anwendung von mineralischen Rohphosphaten. *Acta Agronom. Acad. Sci. Hung.*; 3.
Kröber E., 1909 : Über das Löslichwerden der Phosphorsäure aus wasserunlöslichen Verbindungen unter der Einwirkung von Bakterien und Hefen. *J. Landwirt.*, **57** : 5.
Kunze G., 1906 : Über Säureasscheidung bei Wurzeln und Pilzhyphen und ihre Bedeutung. *Jahrb. wiss. Botan.*, **42** : 357.
Leszlo G., Pop Cl., 1957: La mobilisation des phosphates par certaines espèces de microorganismes. Symposium: Méthodes d'Etudes Microbiologiques du Sol. Vol. 6.
Lipman J. G., Mc Lean A., Lint H. C., 1916 : *Soil Sci.*, **1** : 533.
Muromcew G., 1957 : O roli produktow życzniediejatielnosti poczwiennych mikroorganizmow w mobilizacji P_2O_2 fosforitow. *Agrobiołogija*, **1** : 97.
Perotti R., 1909 : Über den biochemischen Kreislauf der Phosphorsäure im Ackerboden. *Zentr. Bakter. II*, **25** : 409.
Pikowska R. L., 1948: Mobilizacja fosfatów w poczwie w swiazi z życzniediejatielnostiu niekotorych widow mikrobow. *Mikrobiologija* **15** : 362.
Sackett W. G., Patten J., Brown W., 1908 : The solvent action of soil bacteria upon the insoluble phosphates of raw bone meal and natural raw rock phosphate. *Zentr. Bakter, II*, **20** : 688.
Sauerlandt W., 1933 : Über den Kreislauf des Phosphors im Boden. *Phosphorsäure*, **3** : 711.
Sewerin S. A., 1910 : Die Mobilisierung der Phosphorsäure des Bodens unter dem Einfluss der Lebenstätigkeit der Bakterien. *Zentr. Bakter, II*, **28** : 561.
Sewerin S. A., 1912 : Die Mobilisierung der Phosphorsäure des Bodens unter dem Einfluss der Lebenstätigkeit der Bakterien. *Zentr. Bakter, II*, **32** : 498.
Sing Chen Chang, 1939 : The transformation of phosphorus during the decomposition of plant materials. *Soil Sci.*, **48** : 85.
Stoklasa J., 1900 : Über den Einfluss der Bakterien auf die Knochenzersetzung. *Zentr. Bakter. II*, **6** : 554.
Stoklasa J., 1911 : Biochemischer Kreislauf des Phosphations im Boden. *Zentr. Bakter. II*, **29** : 383.
Struthers P. H., Sieling D. H., 1950 : Effect of organic anions on phosphate precipitation by iron and aluminium as influenced by pH. *Soil. Sci.* **69** : 205.
Uarowa W. N., 1956 : Bakteriji razłagajuszczyje trechkalcyniewyj fosfat. *Dokł. WASCHNIŁ*, **6** : 22.
Waksman S. A., 1927 : Principles of soil microbiology. London.

W. Myśków

ROZPUSZCZANIE FOSFORANU WAPNIA PRZEZ BAKTERIE GLEBOWE

Streszczenie

Z gleby i rizosfery kilku roślin uprawnych wyosobniono zespoły drobnoustrojów, rozpuszczających trójfosforan wapnia.

Wyizolowano i dokładniej zbadano dwa szczepy (nr 13 i 14), a zwłaszcza wpływ zródeł węgla i azotu na rozpuszczanie przez nie trójfosforanu.

Przebadano też uruchamianie przez te dwa szczepy fosforu z fosforytu i mączki kostnej.

Wyniki ilustrują tabele i wykresy.

RECENZJE KSIĄŻEK NADESŁANYCH

Wirusologia ogólna, pod redakcją E. Mikulaszka i W. T. Dobrzańskiego, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1960, 70 zł, stron 580.

Nie tylko mikrobiologowie, ale i wszyscy biologowie, lekarze i rolnicy wdzięczni będą redaktorom i autorom za twórczy wysiłek, Komitetowi Mikrobiologicznemu PAN za inicjatywę, a Państwowemu Wydawnictwu Naukowemu za wydanie bardzo od dawna potrzebnej w kraju publikacji.

Książka ta jest owocem zbiorowego wysiłku siedmiu polskich wirusologów. Rozdział I — *O naturze wirusów*, pióra H. Makowera, stanowi doskonałe wprowadzenie w dzieje i podstawowe problemy wirusologii. Jasno i wyczerpująco przedstawia K. Zakrzewski budowę i skład chemiczny wirusów (rozdział II) oraz metody izolacji i badań fizyko-chemicznych nad wirusami (rozdziały III i IV). Wzajemnie uzupełniają się — rozdział V (H. Makower: *Zmienność wirusów*) i rozdział VI (A. Koziński: *Zjawiska genetyczne u wirusów*). Problemem wzajemnych stosunków między wirusem a zakaźną komórką zajmują się trzy następne rozdziały (K. Zakrzewski: *Wirus a komórka gospodarza*, A. W. Koziński i Z. Opara: *Metabolizm komórki zakażonej i aktywność enzymatyczna wirusów*, A. W. Koziński: *Badania nad istotą lizogenii i bakteriocynogenii*). Rozdział X obszernie omawia zagadnienia immunochemii wirusów, (E. Mikulaszek), a rozdział XI zjawiska hemaglutynacji wirusowej (E. Makower i Z. Skurska).

Cennym uzupełnieniem jest rozdział XII: Wirusy w zespołach biocenotycznych H. Makowera.

Ostatni, XIII rozdział, stanowi obszerne studium A. Kozłowskiej o wirusach roślinnych.

Poszczególne rozdziały zaopatrzone są w obszerne zestawienia literatury, a całość w starannie opracowane indeksy rzeczowe i autorów.

Książka daje czytelnikowi podstawowe wiadomości z zakresu całej wirusologii, uwzględniając przy tym przeważnie najnowsze zdobycze w tej dziedzinie.

Pewna niejednolitość ujęcia, a nieraz różny sposób naświetlania poszczególnych problemów w oddzielnych rozdziałach, wynikające z wspomnianych przez redaktorów trudności, nie umniejszają wartości pracy, a niekiedy ułatwiają czytelnikowi wyrobienie sobie własnego sądu.

Wirusologia ogólna powinna być zalecona jako literatura pomocnicza nie tylko dla studentów mikrobiologii, ale dla ogółu studiujących dyscypliny biologiczne (botanicy, zoologowie, biochemicy, lekarze, rolnicy). Będzie ona też pomocna wszystkim interesującym się tak obecnie istotnymi problemami nauki o wirusach, którzy jako nie specjaliści — nie mogą korzystać z prac specjalnych i monografii.

W. Kunicki-Goldfinger

Staining procedures used by Biological Stain Commission, II wydanie pod redakcją H. J. Conna, M. A. Darrow i V. M. Emmela, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1960, cena 5 dolarów.

Książka ta stanowi jakby uzupełnienie zbioru „Manual of pure culture methods.." i H. J. Conna „Biological stain".

W 12 rozdziałach przedstawione są dokładnie i krótko zasadnicze metody utrwalania, odwadniania, zatapiania preparatów, a następnie liczne metody barwienia tkanek zwierzęcych w ogóle (rozdz. 2), tkanki łącznej (rozdział 3), mikroglii i komórek nerwowych (rozdział 4), włókien nerwowych i ich zakończeń (rozdz. 5), krwi, szpiku kostnego i kości (rozdział 6), poszczególnych organelli i składników komórki zwierzęcej (rozdział 7), tkanek roślinnych (rozdział 8), pyłku i łagiewki pyłkowej (rozdział 9), organelli i składników komórki roślinnej (rozdział 10), drobnoustrojów w rozmazach (rozdz. 11) i w tkankach zakażonych zwierząt (rozdz. 12).

Opis procedur stosowanych w technice mikrobiologicznej ograniczony jest do najbardziej powszechnych i podstawowych metod (barwienie podstawowe, negatywne, metodą Grama, bakterii kwasoopornych, endospor, maczugowców błonicy, rzęsek, otoczek, tłuszczu, krętków, riketsji, askospor drożdży) i ich modyfikacji.

Zbiór jest jednak bardzo cenny jako podręczne kompendium, obejmujące wszystkie zasadnicze metody histologi roślin i zwierząt. Wartość książki zwiększa fakt, że wszystkie zalecane tu metody były wielokrotnie sprawdzane przez członków Komisji Barwików Biologicznych.

Książka ta jest starannie wykonana w postaci luźnych kart zszytych systemem „okołozeszytu". Wydawnictwo pożyteczne dla każdego laboratorium biologicznego.

Wł. Kunicki-Goldfinger

SKOROWIDZ AUTORÓW DO VOL. IX

Badura L. — Badania nad mikoflorą ściółki i gleby lasu szpilkowego ze zbocza Raduni (Sępia Góra) 33

Bassalik K., Janota-Bassalik L., Olczyk C., Halweg H. — Méthodes de recherches microbiologiques sur les substances actives des extraits de tourbes 303

Bedryńska-Dobek M. — Étude comparative entre les souches du genre *Actinobacterium, Actinomyces bovis* et *Nocardia asteroides* 331

Bedryńska-Dobek M. — Déterminations des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques, du pouvoir pathogène et de la résistance aux antibiotiques de 9 souches d'*Actinobacterium* et 2 d'*Actinomyces bovis* après la lyophilisation 261

Bedryńska-Dobek M. — Déterminations des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques, du pouvoir pathogène et de la résistance aux antibiotiques de 9 souches de *Nocardia asteroides* 343

Bujak S. — Wpływ szczepienia ogórków bakteriami fermentacji mlekowej na jakość produktu po jego zakiszeniu 199

Bujak S., Imielski A., Zakrzewska I. — Próby zastąpienia mąki jęczmiennej autolizatami drożdży, wycierką ziemniaczaną i wodą sokowa jako dodatkami do zacierów melasowych fermentacji acetonowo-butanolowej

Chomiczewski J. — Odon Bujwid, 30. XI. 1857 — 26. XII. 1942 . . 269

Czerwińska E. — patrz Kowalik R. 59

Drozdowicz A. — Prof. dr Kazimierz Bassalik, 12. VI. 1897—27. VI. 1960 235

Dygdała K. — A new model of heating microscopic stage 355

Halweg H. — patrz Bassalik K. 303

Imielski A. — patrz Bujak S. 269

Januszewicz I. — Wpływ podłoża na aktywność *Leuconostos mesenteroides* 359

Janota-Bassalik L. — patrz Bassalik K. 303

Kączkowski J. i Możejko-Toczko M. — Bakterie rozkładające alkaloidy tropanowe 173

Kłosowska T. i Pawłowska K. — Próby wyjaśnienia bakteriobójczego działania borowin typu wysokiego 191

Kocwa E., Matusiak K., Wcisło H. — Wyodrębnianie aktywnych szczepów *Clostridium acetobutylicum* ze środowisk naturalnych 215

Kowalik R., Czerwińska E. — The preservation of organic coatings in tropical conditions 59

Kowalik R., Sadurska I. — Wpływ tlenku etylenu na kilka przedstawicieli grzybów niszczących drewno 67

Kovats J. — Badania nad fermentacją cytrynową wgłębną 275

Kujawski M., Piller K. — Badania nad otrzymywaniem pleśniowych preparatów enzymatycznych—amylolitycznych oraz ich zastosowanie w przemyśle browarniczym i gorzelnianym. Cz. II. Opis morfologiczny czterech

szczepów *Aspergillus oryzae* oraz wpływ czasu hodowli na ich aktywność amylolityczną 205
Kujawski M. i Piller K. — Badania nad otrzymywaniem pleśniowych preparatów enzymatycznych—amylolitycznych. Cz. III. Próby zastosowania wysłodzin browarnianych (młóta) do produkcji pleśniowych preparatów amylolitycznych 289
Kwiatkowski Z. — Radiation action on the mitotic crossing-over in *Aspergillus nidulans* 253
Lachowicz T. M. — Mechanizm powstawania form opornych na penicylinę 107
Lachowicz T. M. — The mechanism of development *in vitro* of penicillin-resistant variants of *Staphylococcus aureus*. I. The effect of drug concentration on the number of resistant forms 133
Lachowicz T. M. — The mechanism of development *in vitro* of penicillin-resistant variants of *Staphylococcus aureus*. II. Further investigation on the fluctuation test in the study of origin of penicillin-resistance . . 143
Matusiak K. — patrz Kocwa E. 215
Możejko-Toczko M. — Rozkład lupaniny przez *Pseudomonas lupanini* 157
Możejko-Toczko M. — patrz Reifer I. 151
Możejko-Toczko M. — patrz Kączkowski J. 173
Myśkow W. — The dissolving of calcium phosphate by some soil bacteria 367
Nicewicz W. — Postacie przesączalne prątków gruźlicy i ich rola w procesie zakażenia 239
Obojska K. — Fosfomonoesterazy w prątkach kwasoopornych 315
Olczyk C. — patrz Bassalik K. 303
Pawłowska K. — patrz Kłosowska T. 191
Piller K. — patrz Kujawski M. 205, 289
Reifer I., Możejko-Toczko M. — Mikrobiologiczna metoda ilościowego oznaczania lupaniny 151
Sadurska I. — patrz Kowalik R. 67
Wróbel T. — Wpływ liofilizacji szczepów *Rhizobium* na aktywność ich współżycia z roślinami 181
Wcisło J. — patrz Kocwa E. 215
Zakrzewska I. — patrz Bujak S. 269
Zodrow K. — Prof. dr Józef Duda, 6. II. 1911 — 2. VI. 1959 3

SKOROWIDZ RZECZOWY DO VOL. IX

Acetonowo-butanolowa fermentacja — patrz *Clostridium acetobutylicum* . 215
Acetonowo-butanolowa fermentacja — próby zastąpienia mąki jęczmiennej autolizatami drożdży, wycierką ziemniaczaną i wodą sokową jako dodatkami do zacierów melasowych fermentacji acetonowo-butanolowej . 269
Actinobacterium — właściwości morfologiczne, biochemiczne, zdolności chorobotwórcze i wrażliwość na antybiotyki po liofilizacji 261
Actinobacterium, *Actinomyces* i *Nocardia*, badania porównawcze . . . 315
Actinomyces bovis — właściwości morfologiczne, biochemiczne, zdolności chorobotwórcze i wrażliwość na antybiotyki po liofilizacji 261
Actinomyces, *Actinobacterium* i *Nocardia asteroides*, badania porownawcze 315
Alkaloidy tropanowe — rozkład przez bakterie 173

Alkaloidy — patrz też lupanina 157
Amylolityczne preparaty pleśniowe — zastosowanie wysłodzin browarnianych do ich otrzymywania 289
Amylolityczne preparaty, produkcja 205
Antybiotyk, wpływ stężenia penicyliny na ilość form opornych . 107
Antybiotyki — **wrażliwość** *Actinobacterium* i *Actinomyces* . 261
Antybiotyki — wrażliwość *Nocardia* 343
Asperigillus oryzae — opis morfologiczny 205
Asperigillus nidulans — wpływ promieniowania na mitotyczne crossing-over . 253
Autolizaty drożdży, produkt zastępczy mąki jęczmiennej do zacierów melasowych fermentacji acetonowo-butanolowej 269
Bakterie rozkładające alkaloidy tropanowe 173
Bakterie **fermentacji mlekowej**, wpływ na jakość kwaśnych ogórków . 199
Bakterie **glebowe** rozpuszczające fosforany wapnia 367
Bakteriobójcze działanie borowin 191
Bassalik K. — wspomnienie pośmiertne 235
Bibliografia prac z zakresu mikrobiologii ogólnej, rolnej i technicznej za II półrocze 1958 r. 75
Borowiny typu wysokiego — działanie bakteriobójcze 191
Browarniczy przemysł — zastosowanie preparatów amylolitycznych — enzymatycznych 289
Bujwid Odon 9
Clostridiu mAcetobutylicum wyodrębnianie ze środowisk naturalnych 215
Crossing-over mitotyczne u *A. nidulans*, wpływ promieniowania . 253
Cytrynowa fermentacja wgłębna 275
Drewno — niszczące grzyby, wpływ tlenku etylenu 67
Duda J. — wspomnienie pośmiertne 3
Drożdżowe autolizaty — zastosowanie do zacierów melasowych fermentacji acetonowo-butanolowej 269
Etylenu tlenek — wpływ na grzyby niszczące drewno 67
Enzymatyczne-amylolityczne preparaty pleśniowe, otrzymywanie . . 205
Fermentacja acetonowo-butanolowa 269
Fermentacja **cytrynowa, wgłębna** 275
Fluktuacyjny test — zastosowanie do badań penicylino-oporności . 143
Fosfomonoesterazy w prątkach kwasoopornych 315
Fosforany wapnia — rozpuszczanie przez niektóre bakterie glebowe . 367
Glebowe bakterie rozpuszczające fosforany wapnia 367
Gleby leśnej i ściółki mikoflora 33
Gorzelniany przemysł — zastosowanie preparatów enzymatycznych-amylolitycznych 289
Gronkowiec złocisty — patrz *Staphylococcus aureus* . . 122, 143
Gruźlicy prątki, postacie przesączalne 239
Grzyby niszczące drewno — wpływ tlenku etylenu 67
Grzyby — ochrona powłok lakierniczych w warunkach tropikalnych . 66
Grzyby — patrz też „Mikoflora ściółki i gleby lasu szpilkowego“ . . 33
Kiszenie ogórków, wpływ bakterii fermentacji mlekowej na ich jakość 199
Kwasooporne prątki — patrz prątki kwasooporne 315
Lakiernicze powłoki, ich **ochrona** w warunkach tropikalnych . . 66
Las — mikoflora gleby 33
Leuconostoc mesenteroides, wpływ na zdolności dekstrantwórcze podłoża . 359

Liofilizacja — wpływ na aktywność *Rhizobium* 181
Liofilizacja — wpływ na właściwości *Actinobacterium* i *Actinomyces* . . . 261
Lupanina — oznaczanie ilościowe metodą mikrobiologiczną 151
Lupanina — rozkład przez *Pseudomonas lupanini* 157
Mąka jęczmienna, próby jej zastąpienia w zacierach melasowych fermentacji acetonowo-butanolowej 269
Melasowe zaciery w fermentacji acetonowo-butanolowej 269
Mikoflora ściółki i gleby lasu szpilkowego 33
Mikrobiologiczne oznaczenie wpływu substancji czynnych wyciągów torfowych 303
Mikrobiologiczna metoda oznaczania ilości lupaniny 151
Mikroskopowy stolik ogrzewany 355
Mitotyczne crossing-over u *Aspergillus nidulans*, wpływ promieniowania . . 253
Mlekowej fermentacji bakterie — patrz bakterie fermentacji mlekowej . . 199
Młóto — patrz wysłodziny browarniane 289
Nocardia asteroides, *Actinobacterium* i *Actinomyces* — **badania porównawcze** 315
Nocardia asteroides, *Actinobacterium* i *Actinomyces* **właściwości** 343
Ogórki — szczepienie bakteriami fermentacji mlekowej, wpływ na jakość . . 199
Oporne na penicylinę formy, mechanizm powstawania 107
Oporne na penicylinę formy — patrz też penicylinooporność . . . 107, 133, 143
Oporność na antybiotyki 107
Penicylina — mechanizm powstawania form opornych 107
Penicylinooporność, mechanizm powstawania 133, 143
Pleśniowe preparaty enzymatyczne-amylolityczne 205
Powłoki lakiernicze, ich ochrona w warunkach tropikalnych 66
Prątki gruźlicy, postacie przesączalne. 239
Prątki kwasooporne — zawartość fosfomonoesterazy 315
Przesączalne postacie prątków gruźlicy — rola w procesie zakażenia . . . 239
Promieniowanie — wpływ na mitotyczne crossing-over u *Aspergillus nidulans* 253
Pseudomonas lupanini, rozkład lupaniny 157
Rhizobium, wpływ liofilizacji 181
Roślina — współżycie z *Rhizobium*, wpływ liofilizacji bakterii 181
Sokowa woda — patrz woda sokowa 269
Staphylococcus aureaus, mechanizm oporności na penicylinę 133, 143
Stolik mikroskopowy ogrzewany 355
Ściółki leśnej i gleby mikoflora 33
Szczepienie ogórków bakteriami fermentacji mlekowej 199
Test fluktuacyjny — patrz fluktuacyjny test 143
Tlenek etylenu, wpływ na przedstawicieli niszczących drewno 67
Torf — mikrobiologiczne oznaczanie czynnych wyciągów 303
Tropanowe alkaloidy — patrz alkaloidy tropanowe 173
Wapnia fosforan — patrz fosforan wapnia 367
Woda sokowa — próby zastąpienia mąki jęczmiennej w zacierach melasowych fermentacji acetonowo-butanolowej 269
Wyciągi torfowe — patrz torf 303
Wycierka ziemniaczana — próby zastąpienia mąki jęczmiennej do zacierów melasowych fermentacji acetonowo-butanolowej 269
Wysłodziny browarniane — zastosowanie do produkcji pleśniowych preparatów amylolitycznych 289
Zaciery melasowe fermentacji acetonowo-butanolowej 269

SPIS TREŚCI

1. K. Bassalik, L. Janota-Bassalik, C. Olczyk, H. Halweg: Méthodes de recherches microbiologiques sur les substances actives des extraits de tourbes
Metody mikrobiologiczne oznaczania wpływu substancji czynnych wyciągów torfowych 303
2. K. Obojska: Fosfomonoesterazy w prątkach kwasoopornych
Phosphomonoesterases in acidfast mycobacteria 315
3. M. Bedryńska-Dobek: Étude comparative entre les souches du genre *Actinobacterium, Actinomyces bovis* et *Nocardia asteroides*
Badania porównawcze nad szczepami z rodzaju *Actinobacterium, Actinomyces bovis* i *Nocardia asteroides* 331
4. M. Bedryńska-Dobek: Détermination des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques, du pouvoir pathogène et de la résistance aux antibiotiques de 9 souches de *Nocardia asteroides*
Właściwości morfologiczne, hodowlane, biochemiczne i chorobotwórcze oraz odporność na antybiotyki 9 szczepów *Nocardia asteroides* 343
5. K. Dygdała: A new model of heating microscopic stage
Nowy model mikroskopowego stolika ogrzewanego 355
6. I. Januszewicz: Wpływ podłoża na aktywność *Leuconostoc mesenteroides*
Influence of culture-medium on dextran productivity of *Leuconostoc mesenteroides* 359
7. W. Myśkow: The dissolving of calcium phosphate by some soil bacteria
Rozpuszczanie trudno przyswajalnych fosforanów wapnia przez niektóre bakterie glebowe 367
8. Recenzje z nadesłanych książek:
a) Staining procedures used by Biological Stain Commision, II wydanie. 375
b) Wirusologia ogólna 376
9. Skorowidz autorów do Vol. IX 377
10. Skorowidz rzeczowy do Vol. IX 378

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej, nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*, Wrocław, skrytka pocztowa nr 73.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) muszą być uprzednio akceptowane przez tłumacza Redakcji; należy do nich dołączyć wersję polską i streszczenie w języku polskim. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku polskim oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, dwukropek, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie, 75 odbitek nie zszywanych — po cenie zryczałtowanej (około 2 zł za stronę druku).

* *
*

Zgodnie z poleceniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, począwszy od tomu X (rocznik 1961) prace oryginalne będą publikowane w języku angielskim lub francuskim.

Zmiana ta będzie stopniowo wprowadzana w życie już w 1960 r.

W związku z powyższym objętość prac zostanie ograniczona do maksimum 1 arkusza wydawniczego. Prace mogą być nadsyłane w wersji polskiej z załączonym słownikiem stosowanych terminów fachowych w języku publikacji. Tłumaczenie w takim przypadku wykona Redakcja na koszt autora. Prace przygotowane w wersji obcej muszą uprzednio uzyskać akceptację jednego z tłumaczów Redakcji. Do wersji obcej należy dołączyć 1 egzemplarz w wersji polskiej.

Cena zł 25.—

Warunki prenumeraty kwartalnika

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

Cena w prenumeracie zł 100,— rocznie
zł 50,— półrocznie

Zamówienia i wpłaty przyjmują:

1. Przedsiębiorstwo Upowszechniania Prasy i Książki „Ruch" Wrocław, ul. Oławska 10/11, konto PKO nr 8-6-13768
2. Urzędy pocztowe

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch", Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100-024.

Bieżące numery do nabycia w księgarniach naukowych „Domu Książki" oraz w Ośrodku Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych Polskiej Akademii Nauk — Wzorcownia Wydawnictw Naukowych PAN — Ossolineum — PWN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter).

Prenumeratę na rok 1961 przyjmują od dnia 15 listopada 1960:

Przedsiębiorstwo Upowszechniania Prasy i Książki „Ruch" Wrocław, ul Oławska 10/11, konto PKO nr 8-6-13768 oraz w całym kraju urzędy pocztowe, listonosze i delegatury „Ruchu"

Tylko prenumerata zapewnia regularne otrzymywanie czasopisma